

**BESIEDLUNG UND FOLGEN EINER
ZWEITTRANSPLANTATION
HÄMOPOETISCHER ZELLEN
AUF KNOCHENMARKSCHIMÄREN**

Volker Hüttl

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hämatologie der
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
München

BESIEDLUNG UND FOLGEN EINER
ZWEITTRANSPLANTATION HÄMOPOETISCHER ZELLEN
AUF KNOCHENMARKSCHIMÄREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von
Volker Hüttl

aus
München

Jahr

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.S.Thierfelder

Mitberichterstatter: Prof.Dr.R.Marx

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.10.1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Herrn Prof.Dr.med.Thierfelder möchte ich für
die Überlassung des Themas danken. Herrn Dr.
med.E.Thiel danke ich für die Betreuung wäh-
rend der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	S. 2
Material und Methodik	S. 9
Ergebnisse	S. 17
Diskussion	S. 56
Zusammenfassung	S. 70
Literaturverzeichnis	S. 72

EINLEITUNG

Eine Transplantation wirft grundsätzlich zwei Probleme auf. Das erste Problem ist ein technisches; wo es gelöst ist, beginnt das zweite, das immunologische. Hier soll im Wesentlichen nur von letzterem die Rede sein.

Die intakten immunkompetenten Zellen eines Empfängers werden das Transplantat eines inkompatiblen Spenders notwendig attackieren, es wird eine host-versus-graft-Reaktion ablaufen, die schließlich eine Abstoßung des Transplantats zur Folge hat. Dies darf auch dann erwartet werden, wenn mit Zellen des hämopoetischen Systems immunkompetente Zellen übertragen werden (1).

Ein prinzipiell anderes Geschehen liegt vor, wenn der Empfänger seines Immunsystems beraubt ist, sei es durch letale Ganzkörperbestrahlung, sei es durch andere immunsuppressive Maßnahmen. Bekommt ein solcherart vorgeschädigter Empfängerorganismus immunkompetente Zellen übertragen, so werden nun ihrerseits die Spenderzellen den Empfänger als fremd erkennen, es wird in diesem Fall eine graft-versus-host-Reaktion ablaufen.

Von Bedeutung wurde dieser Mechanismus als man in den fünfziger Jahren damit begann, sich intensiv mit der Therapie von Strahlen-

schäden zu befassen. 1949 hatten JACOBSEN et al. (2) Mäuse vor den Folgen einer an sich letalen Bestrahlung dadurch schützen können, daß sie die Milz von der Bestrahlung ausnahmen; dies verhinderte das bone marrow syndrome (auch als radiation sickness bezeichnet) oder schwächte es zumindest ab. 1951 gelang es LORENZ et al. (3) letal bestrahlte Mäuse durch Übertragung von Mäuseknochenmark am Leben zu erhalten.

BARNES und LOUTIT (4) berichteten 1954 erstmals über die Sekundärkrankheit. Sie hatten durch Transplantation von Milzzellen im allogenen⁺ System letal bestrahlte Mäuse zum Teil

+

Hier sollen kurz die Begriffe 'syngen', 'allogen' und 'semiallogen' erläutert werden: 'Syngen' wird im Sinne von 'genetisch identisch' gebraucht; Individuen von derselben genetischen Konstitution, wie eineiige Zwillinge oder Tiere eines Inzuchtstammes sind zueinander syngen.

Unter 'allogen' versteht man 'genetisch anders bzw. fremd', d.h. Tiere unterschiedlicher genetischer Konstitution, aber von derselben Spezies, sind zueinander allogen.

Von 'semiallogen' schließlich wird dann gesprochen, wenn nur ein Haplotyp eines Individuums mit dem eines anderen identisch ist, anders ausgedrückt: wird von F₁-Hybriden auf einen der beiden Parentalstämme oder umgekehrt transplantiert, so geschieht dies in einem semiallogenen System.

vor der 'Primärkrankheit', dem bone marrow syndrome, schützen können, jedoch lebte keines der Tiere bis zum 100. Tag nach Bestrahlung. Diese verzögert auftretende Sekundärkrankheit wurde in der Folgezeit tierexperimentell gründlich untersucht.

Bei Mäusen können zwei Formen der Sekundärkrankheit unterschieden werden, einmal die akute Sekundärkrankheit, die nach Transplantation von Milzzellen in einem inkompatiblen Empfänger auftritt und in deren Verlauf die Tiere innerhalb von 20 Tagen sterben, zum anderen die chronische Sekundärkrankheit, die nach Transplantation von Knochenmark auftritt und erst nach dem 20. Tag post transplantationem zum Tode führt.

Das klinische Bild der Sekundärkrankheit variiert geringfügig je nach Spezies. Bei der chronischen Sekundärkrankheit in Mäusen stehen Diarrhoe und Gewichtsabnahme im Vordergrund; es kommen Hautschädigungen wie Alopezie, Schuppung und Erythem hinzu; häufig auftretende infektiöse Komplikationen dürften auf die Atrophie der lymphatischen Gewebe zurückzuführen sein. Art und Schweregrad der Sekundärkrankheit sind nicht nur, wie bereits erwähnt, von der transplantierten Zellart abhängig, sondern sind auch korreliert mit der Strahlendosis, der Dosis der transplantierten Zellen und natürlich dem Grad der Inkompatibilität von Spender und Empfänger.

Daß eine graft-versus-host-Reaktion der Sekundärkrankheit als pathogenetischer Mechanismus zugrundeliegt, läßt sich in einem semiallogenen System zeigen. Transplantiert man nämlich parentale Zellen auf die Filialgeneration, so werden die immunkompetenten Zellen des Transplantats den vom anderen Elternteil ererbten Haplotyp⁺ des Empfängers als immunologisch fremd erkennen und attackieren; die Empfänger werden eine Sekundärkrankheit zeigen. Transplantiert man hingegen F₁-Hybrid-Zellen einem Elternteil, so wird keine graft-versus-host Reaktion ablaufen können, da die immunkompetenten Zellen des Spenders keine fremden Antigene vorfinden; vielmehr haben sie in ihrem einen Haplotyp selbst dieselben Antigenstrukturen wie die parentalen Empfänger. Abb.1 soll die geschilderten Verhältnisse veranschaulichen (s. S. 6).

Methoden zur Vermeidung der Sekundärkrankheit, die sich am zugrundeliegenden Pathomechanismus der graft-versus-host-Reaktion orientieren, werden entweder darin bestehen müssen, verhältnismäßig kompatible Spender zu verwenden

+

Unter 'Haplotyp' versteht man das von einem der beiden paternalen Allele ausgeprägte Merkmal eines Gens.



Abb. 1:

Immunkompetente Zellen eines Spenders (BB), die einem Empfänger (AB) übertragen werden, der nicht gegen die fremden Zellen reagieren kann, können gegen die Antigene des Empfängers (genauer: gegen den Haplotyp A) reagieren, da diese als fremd erkannt werden.

Der Empfänger jedoch kann nicht gegen die Spenderzellen (B) reagieren, da er gegen B tolerant ist. Hier ist ein semiallogenes (parentale Zellen auf F₁-Hybriden) Transplantationssystem dargestellt.

den oder das Transplantat so zu verändern, daß wohl die hämopoetischen Zellen übertragen werden, weniger aber die immunkompetenten, den Empfänger attackierenden Zellen. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, nach der an zweiter Stelle genannten Möglichkeit vorzugehen; einige seien genannt. So wurde versucht, die Sekundärkrankheit durch Transplantation von foetalen hämopoetischen Zellen zu vermeiden, ein Teilerfolg konnte erreicht werden (34). Auch

die Vorbestrahlung von Spendern war von gewissem Nutzen (35). Die sicherste Methode zur Vermeidung der Sekundärkrankheit scheint jedoch die Vorbehandlung des Spenders mit Antilymphozytenserum zu sein (10, 17). In der Tat ist es nämlich möglich, mit Antilymphozytenserum einer anderen Spezies (s. auch Methodikteil, S. 9f) in vivo hinreichend selektiv, bestimmte Anteile des Immunsystems des Spendertieres auszuschalten, derart daß die Hämpoese des Empfängers voll restituiert wird, mit anderen Worten: der Empfänger als Chimäre überleben kann, ohne an einer Sekundärkrankheit zugrunde zu gehen⁺.

In der vorliegenden Arbeit wurde im semiallogenen System (s. auch Abb. 1 und Anmerkung S.3) eine Spendervorbehandlung mit Antilymphozytenserum vorgenommen⁺⁺, von der bekannt war, daß sie die graft-versus-host-Reaktion verhindern würde. Auf diese Weise wird der Empfänger mit einem fremden hämopoetischen System ausgestattet. In den so erzeugten Chimären waren offenbar durch die Spendervorbehandlung mit Antilymphozytenserum die parentalen Zellen gegen

+

Nach FORD et al. (6) sind unter 'radiation chimaera' Tiere zu verstehen, die nach Bestrahlung und Transplantation hämopoetischer Zellen von einem anderen Tier ein fremdes blutbildendes System haben.

++

Der genaue Modus der Spendervorbehandlung mit Antilymphozytenserum ist im Methodikteil auf S. 9 geschildert.

den fremden Haplotyp der F_1 -Hybriden tolerant gemacht worden, da der Empfänger nicht mehr vom parentalen Spender attackiert wurde. Diese Chimären bekamen dann in einer zweiten Transplantation erneut Zellen des Parentalstammes übertragen, wobei diesmal der Spender allerdings gegen den Empfänger vorsensibilisiert worden war, was ohne 'vorgeschaltete' Ersttransplantation mit Sicherheit zu einer graft-versus-host-Reaktion führen müßte. Die Frage war nun, ob durch die zweite Transplantation die bestehende Toleranz gegenüber dem Empfänger aufgehoben werden würde oder ob das vorsensibilisierte Zweittransplantat ebenfalls Toleranz gegenüber den Empfängerantigenen zeigen würde. Mit anderen Worten: konnte durch die 'Vorschaltung' der ersten Transplantation die andernfalls obligate graft-versus-host-Reaktion vermieden werden? Eine Frage, die durchaus von klinischem Belang sein kann, dann nämlich, wenn beim Menschen nach einer ersten Knochenmarktransplantation eine zweite aus vitalen Gründen notwendig wird.

MATERIAL und METHODIK

I. Versuchstiere

Die Versuchsmäuse wurden von den Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA, bezogen oder stammten aus Weiterzüchtungen im Tierstall des Instituts für Hämatologie. Das Alter der Tiere lag bei Versuchsbeginn zwischen 10 und 12 Wochen. Bis zu 12 Tiere wurden in Makrolon-Käfigen Typ II gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Als Futter wurde Sniff-Mäusefutter gegeben (Altromin). Dem Trinkwasser war Streptomycin in einer Konzentration 1:25000 zugesetzt. Spender und Empfänger waren stets gleichen Geschlechts. Die verwendeten hoch ingezüchteten Stämme waren folgende:

1. Empfängertiere: F_1 -Hybriden C57Bl/6J x CBA/J⁺,
2. Spendertiere: a) CBA/J⁺-T6 und CBA/J⁺⁺
b) CBA/J-T6-T6
c) (C57Bl/6 x CBA/J-T6) F_1
3. Zur Vorimmunisierung: C57Bl/6J⁺

II Antilymphozytenserum

1. Herstellung:

Bei dem verwendeten Antilymphozytenserum (im folgenden kurz ALS) handelt es sich immer um ein Kaninchen-anti-Maus-Lymphozytenserum, das modifiziert nach der Methode von GRAY et al. (5) wie folgt hergestellt wurde: 12 Wochen alte

+

Der Einfachheit halber wird im weiteren Text abgekürzt: CBl für C57Bl/6J und CBA für CBA/J

++

Wenn kein Spenderzellnachweis durchgeführt wurde, war es nicht vonnöten, einen Stamm mit dem T6-Markerchromosom zu benützen

Kaninchen erhielten zur Erstimmunisierung 10^8 CBl-Lymphknotenzellen intravenös. Aus praktischen Erwägungen, um die Zellausbeute zu verbessern, bekamen die CBl-Spender, eine Woche bevor die Lymphknotenzellen gewonnen wurden, 10^6 CBl-Leukämiezellen injiziert. 3 Wochen nach der Erstimmunisierung wurden die Kaninchen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen - wiederum mit jeweils 10^8 Lymphknotenzellen - geboostert. 4 Tage nach Abschluß dieser Behandlung wurden die Tiere entblutet. Nach Absetzen des Blutkuchens wurde das überstehende Serum abpipettiert und zweimal 10 Minuten lang mit 4000 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene ALS wurde zur Sterilisierung mit Na-Merthiolat versetzt. Die Seren von mehreren Kaninchen wurden gepoolt und bei -20°C aufbewahrt.

2. Testung:

Vor Verwendung eines ALS-Pools wurde dieser zunächst hinsichtlich der Toxizität, der Lymphocytotoxizität und der Immunsuppression getestet.

a) Toxizität: 6 CBl-Mäuse bekamen während 4 Tagen 0,25 ml ALS/die intraperitoneal injiziert. Starben einige Tiere an einer allergisch-toxischen Reaktion, wurde das Serum als zu toxisch befunden und nicht verwendet.

b) Lymphocytotoxizität: Die lymphocytotoxische Aktion von ALS läuft unter Verbrauch von Komplement ab. Der jeweilige Komplementschwund wurde mittels sensibilisierter Hammelerythro-

cyten festgestellt. ALS wurde dann weiter benützt, wenn sich ein Titer von mindestens 1:256 ergab.

c) Immunsuppression: Mäuse wurden 6 Tage lang mit ALS in einer Menge von 0,25 ml/die intraperitoneal behandelt. Am 7. Tag bekamen sie ein allogenes Hauttransplantat. Das ALS wurde dann als genügend immunsuppressiv eingestuft, wenn die Transplantatabstoßung merklich später eintrat, als bei einer nicht mit ALS behandelten Kontrollgruppe.

Das verwendete ALS mußte allen drei geschilderten Kriterien genügen.

3. Applikationsschema:

Die für die erste Transplantation vorgesehenen CBA-Spendertiere erhielten an 6 aufeinanderfolgenden Tagen 0,25 ml ALS intraperitoneal. Einen Tag nach Abschluß dieser Behandlung erfolgte die Transplantation. (Abkürzung für dieses Schema im weiteren Text: CBA-Milzzellen 6/1 ALS.)

III Vorimmunisierung

Die für die zweite Transplantation vorgesehenen CBA-Spendertiere wurden gegen den CB1-Anteil im Empfänger in folgender Weise vorsensibilisiert: die CBA-Mäuse bekamen im Abstand von 5 Tagen insgesamt dreimal jeweils 50×10^6 CB1-Milzzellen i.p. injiziert. Eine Woche nach der letzten Injektion von CB1-Milzzellen wurde die zweite Transplantation vorgenommen. Bei Ver-

such IV konnte aus zeitlichen Gründen nur zweimal - am 12. und am 6. Tag vor Zweittransplantation - vorsensibilisiert werden.

IV Bestrahlung

Alle Empfängertiere wurden 24 Stunden vor der Ersttransplantation einer letalen Ganzkörperbestrahlung von 900 r unterworfen. ¹³⁷Caesium (Siemens, Typ Caesa Gammatron, 7 KCi) diente als Strahlungsquelle. Die Dosisrate betrug 60 r/min. War vor der Zweittransplantation eine weitere Ganzkörperbestrahlung vorgesehen, wurde in derselben Weise vorgegangen; die Bestrahlungsdauer war jedoch entsprechend verkürzt.

Im Falle der Teilkörperbestrahlung vor der Zweittransplantation diente als Strahlenquelle eine Röntgenröhre (Spannung: 300 KV; Stromstärke: 4 mA). Gefiltert wurde die Strahlung mittels eines 0,9 mm starken Cu-Filters und eines 1 mm starken Al-Filters. Die Dosisrate betrug 60 r/min. Der Abstand der Tiere vom Fokus war 33 cm. Die hintere Körperhälfte der Tiere wurde mit 500 r bestrahlt, während die vordere mit 2 mm dickem Blei abgedeckt wurde und somit weniger als 30 r ausgesetzt war.

V Transplantation

Es wurden stets Milzzellen transplantiert. Nachdem die Spendertiere mit Äther getötet worden waren, wurde ihnen unter aseptischen Be-

dingungen die Milz entnommen, in physiologischer Kochsalzlösung zerkleinert und anschließend durch sterile Gazetupfer gefiltert. Die so gewonnenen Zellen wurden 10 min lang mit 2000 RPM zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, so daß die gewünschte Zellzahl in 0,3 ml enthalten war. Den Empfängertieren wurden die Zellen in die Schwanzvene injiziert. Bei Transplantation von 10^8 Zellen wurden die Empfängertiere eine halbe Stunde vor der Zellgabe mit Heparin intraperitoneal vorbehandelt, um Lungenembolien vorzubeugen.

VI Spenderzellnachweis

Der Nachweis von spender- bzw. empfängereigenen Zellen in den Chimären (Tiere, die mit einem fremden hämopoetischen System leben) wurde modifiziert nach FORD et al. (6) durchgeführt. In allen Versuchen⁺ wiesen die Zellen a) der Empfänger kein Markerchromosom (als T_0 bezeichnet), b) der Erstspender ein Markerchromosom (als T_6 bezeichnet), c) der Zweitspender zwei Markerchromosomen (als T_{66} bezeichnet) auf. (Abb. 2).

Begutachtet wurden die Zellen von Milz, Knochenmark und wo möglich auch der Lymphknoten.

+

Mit Ausnahme der Gruppe I, in der auch die Spenderzellen kein Markerchromosom aufwiesen.

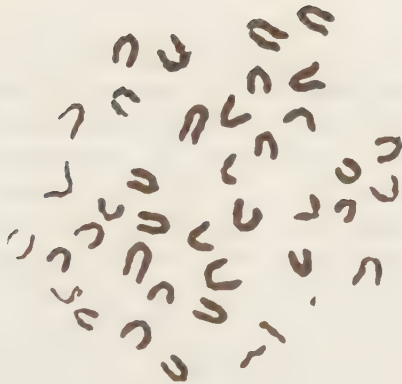


Abb. 2:

Mitose einer Maus mit einem T_6 -Markerchromosom

2,5 bis 3 Stunden vor Gewinnung der Zellen wurde den Tieren 0,0004 - 0,0005 mg/g Körpergewicht (oder ca. 0,01 mg pro Maus) Colchicin verabreicht, mit dem Ziel, eine größere Häufigkeit von Mitosefiguren in der Metaphase zu erreichen. Die Milz wurde nach der Entnahme gewogen und anschließend in Hank'scher Lösung zerkleinert. Knochenmarkszellen wurden aus Femora und Tibiae, bei teilkörperbestrahlten Tieren außerdem aus den Humeri in folgender Weise entnommen: die Epiphysen der Knochen wurden abgeschnitten, mit Hank'scher Lösung perfundiert und durch wiederholtes Aufziehen ebenfalls in Hank'sche Lösung gegeben, in kleine Stücke geschnitten und in einem Potter zerkleinert.

Die Zellen wurden anschließend 10 min lang mit 800 RPM zentrifugiert und nachdem der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt worden war, mit hypotoner 0,95%iger Na-Citrat-Lösung bei 37°C 20 min inkubiert. Danach wurde erneut unter den angegebenen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit Fixativ (3 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig) versetzt. Nach zehnminütiger Einwirkungsdauer des Fixativs wurde zentrifugiert, das Fixativ abgegossen und wieder neues zugefügt. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei- bis viermal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette auf die Objektträger aufgebracht, nach kurzem Abflammen in der Luft getrocknet und in 5%iger Giemsalösung 10 min gefärbt.

Es wurden nur Mitosen mit vollständigem Chromosomensatz bewertet, es sei denn eine Mitose enthielt das T₆-Chromosom zweimal. Wenn es möglich war, wurden pro Tier und Zellpopulation 100 Mitosen begutachtet.

VII Gewichtskontrollen und Überlebenszeit

Die Tiere wurden - abgesehen vom ersten Versuch - vom Tag der Ersttransplantation an wöchentlich gewogen. Die Gewichte für gleiche Versuchsgruppen sind jeweils gemittelt und mit Standardabweichung angegeben.

Die Überlebenszeiten der einzelnen Tiere sind sowohl auf den Tag der ersten als auch den

der zweiten Transplantation bezogen; wenn möglich wurden die Tiere seziert, um die Todesursache festzustellen.

VIII Kriterien zur Beurteilung der Sekundärkrankheit

Da keine histologischen Untersuchungen vorgenommen wurden, dienten als Kriterien zur Beurteilung der Sekundärkrankheit Gewichtsabnahme, Diarrhoe, Hautveränderungen im Sinne einer Dermatitis wie Schuppung und Erythem, sowie struppiges Fell.

ERGEBNISSE

Das Prinzip der durchgeführten Versuche war stets dasselbe. 24 Stunden nach einer Ganzkörperbestrahlung von 900 r wurden den Empfängern 100×10^6 parentale, semiallogene Milzzellen transplantiert⁺. Um die in diesem System akut auftretende Sekundärkrankheit mit Sicherheit zu vermeiden, wurden die Spender-tiere mit ALS vorbehandelt. 10 Tage nach dieser 1. Transplantation erhielten die so erzeugten Chimären erneut parentale Zellen, die ebenfalls semiallogen zum Empfänger, jedoch syngen zu den bei der ersten Transplantation applizierten Zellen waren; gegen den CBl-Anteil des Empfängers waren die Zweitspender zudem vorsensibilisiert worden, was bei alleiniger Transplantation dieser Zellen ebenfalls zu akuter Sekundärkrankheit führen müßte. Bei der hier durchgeführten 'Hintereinanderschaltung' von zwei Transplantationen wurde chromosomenanalytisch der Grad des erreichten Chimärismus untersucht, sowie das mögliche Auftreten von Sekundärkrankheit beurteilt vor allem am Parameter der Gewichtsabnahme und dem Auftreten von Diarrhoe.

Bei der zweiten Transplantation wurde die Versuchsanordnung variiert nach:

+

Nur die Kontrollgruppen IV A 2, B 2 und C 2 erhielten bei der Ersttransplantation empfangersyngene, d.h. (CBl x CBA)F₁ Zellen transplantiert.

- a) der Zahl der transplantierten Zellen,
- b) der Art der Bestrahlung - ob Ganzkörper- oder Teilkörperbestrahlung - und
- c) der Strahlendosis.

I Unterschiedliche Zellzahlen bei der zweiten Transplantation

3 Gruppen zu je 9 Tieren wurden in einem Vorversuch bei der Zweittransplantation verschiedenen hohe Zelldosen übertragen. Die Empfänger wurden vor der zweiten Transplantation nicht bestrahlt.

Variiert wurde in diesen Gruppen die transplantierte Zelldosis. Sie betrug jeweils

- a) 10^5 Milzzellen
- b) 10^6 Milzzellen und
- c) 10^7 Milzzellen⁺. (s. Abb. 3 auf S. 19)

Die Tiere wurden von der 18. bis zur 53. Woche nach Zweittransplantation gewogen; Chromosomenanalysen wurden nicht durchgeführt (weshalb auch keine T_6 -Marker nötig waren).

Ad A) Es starben je 1 Tier in der 27., in der 40. und in der 51. Woche. Die überlebenden 6 Tiere hatten am Ende der Beobachtungszeit ein Durchschnittsgewicht von 25,5 g.

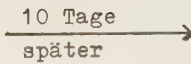
Ad B) In dieser Gruppe starben je 1 Tier in der 19., in der 20., in der 37. und in der 52. Woche. Das Durchschnittsgewicht der überlebenden Tiere betrug am Ende der Beobachtungszeit 25,7 g

⁺
Diese Gruppen werden im folgenden Text als Gruppe I A, I B und I C bezeichnet.

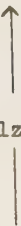
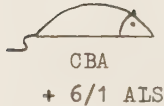
Ganzkörper-
bestrahlung
900 r




10 Tage
später




10⁸ Milzzellen

A) 10⁵
B) 10⁶ Milzzellen
C) 10⁷




vorsensibilisiert
gegen CBl

I. Transplantation

II. Transplantation

Abb. 3:

Schema zu Versuch I

Ad C) Hier überlebten alle Tiere die gesamte Versuchsdauer. Bei Abschluß des Versuches wiesen sie ein durchschnittliches Gewicht von

30,9 g auf.

(Zur Überlebenszeit s. Abb. 4).

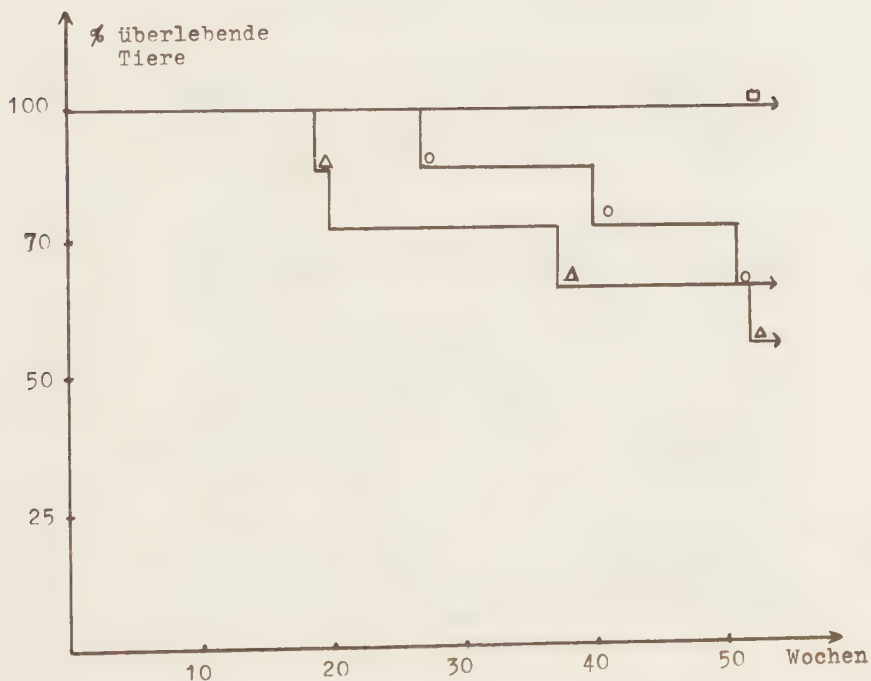


Abb. 4:
Überlebenszeit in %; ○ I A, △ I B und □ I C

II Unterschiedliche Bestrahlungsart und Zellzahl

In 4 Gruppen zu je 8 bzw. 9 Tieren wurde vor der zweiten Transplantation wie folgt vorge-

gangen:

- A) Transplantation von 10^6 Zellen, ohne Bestrahlung (entspricht Versuch IB),
- B) Transplantation von 10^8 Zellen, ohne Bestrahlung,
- C) 500 r Teilkörperbestrahlung und Transplantation von 10^6 Zellen und
- D) 500 r Teilkörperbestrahlung und Transplantation von 10^8 Zellen ⁺ (Abb. 5 S. 22).

Chromosomenanalysen wurden am 10. und am 22. Tag nach Zweittransplantation vorgenommen. (s. Tab. 1 und 2).

Ad A) Von den 8 Tieren dieser Gruppe starb 1 Tier 4 Tage nach Zweittransplantation, ein weiteres nach 22 Tagen. In beiden Fällen konnte keine Sekundärkrankheit festgestellt werden. Je 3 Tiere wurden zur Durchführung der beiden Chromosomenanalysen getötet.

In der Milz fanden sich 10 Tage nach Zweittransplantation $2/3$ T_6 -Spenderzellmitosen; empfängereigene und T_{66} -Spenderzellen hielten sich mit 16% bzw. 17% in etwa die Waage.

Im Knochenmark⁺⁺ war der Grad des Chimärismus ähnlich ausgeprägt: T_6 -Spenderzellen ließen sich zu über 70% nachweisen, empfängereigene

+

Von diesen Gruppen wird im folgenden Text als Gruppe bzw. Versuch II A, II B, II C und II D gesprochen

++

Wo nicht anders vermerkt, wurden die Werte für Knochenmark stets nur an Hand von Untersuchungen der Femora ermittelt.

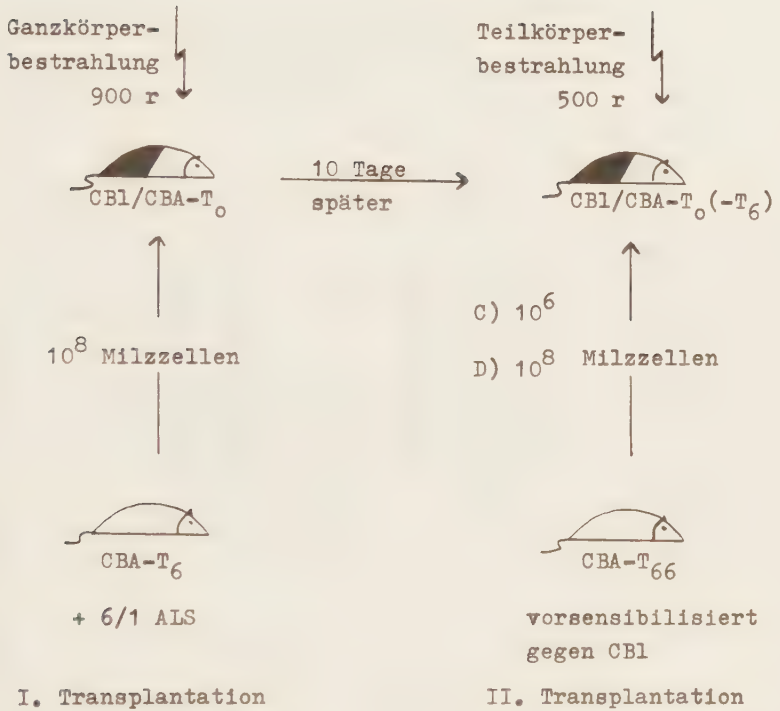


Abb. 5: Schema zu den Versuchen IIC und IID

Zellen lagen unter 10%, T₆₆-Spenderzellen dagegen bei 20%.

22 Tage nach Zweittransplantation ergab sich für die T₆-Spenderzellen ein fast identisches Bild. Die Empfängerzellen waren durchweg auf rund 5% (sowohl in Milz, Knochenmark und Lymph-

Tier Nr.	Todes- zeit	Todesursache	Milzgewichte	Bemerkungen	Chromosomenanalytische Ergebnisse		
					T ₀	T ₆	T ₆₆
A	1	~ 14/4		LK inguinal vergrößert			
	2	20/10	70 mg	LK vergrößert	Mitosen nicht beurteilbar		
	3	20/10	80 mg	LK vergrößert	Milz: Femur: LK:	20 9 74 14-67%	16 17 5-24%
	4	20/10	60 mg	LK vergrößert	Milz: Femur:	12 8 70 70	18 22
	5	30/20		nicht beurteilbar			
	6	32/22		C.A.			
	7	32/22	80 mg	LK vergrößert	Milz: Femur: LK:	4 6 66 70 64	33 27 24
	8	32/22	90 mg	LK vergrößert	Milz: Femur: LK:	7 1-5% 15-75%	25 21 4-20%
B	1	11/1		heparinbedingte Blutung			
	2	20/10	80 mg	LK vergrößert	Milz: Femur:	2 1 62 82	36 37
	3	20/10	160 mg	LK vergrößert	Milz: Femur:	3 1 55 64	42 35
	4	20/10	110 mg	LK vergrößert	Milz: Femur:	4 4 67 73	29 23
	5	32/22	120 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	5 8 66 68	29 24
	6	32/22	90 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	4 6 72 71	24 23
	7	32/22	90 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	5 7 67 26	28 26
	8	32/22	130 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	6 1-4% 64 10-64%	30 8-32%

Tab. 1: Daten zu Versuch 11 A und 11 B.

Erläuterungen: In der Rubrik "Todeszeit" ist angegeben am wievielen Tag nach Erstransplantation Zahl vor dem Querstrich bzw. nach Zweittransplantation (Zahl hinter dem Querstrich) das betreffende Tier gestorben ist.
 "C.A." = Chromosomenanalyse
 "LK" = Lymphknoten.

Die chromosomenanalytischen Ergebnisse wurden wenn nötig auf 100% umgerechnet.

knoten gesunken, zugunsten einer entsprechenden Proliferation von T_{66} -Spenderzellen. Die Verhältnisse im Lymphknotengewebe gleichen denen im Knochenmark (s. Abb. 6)

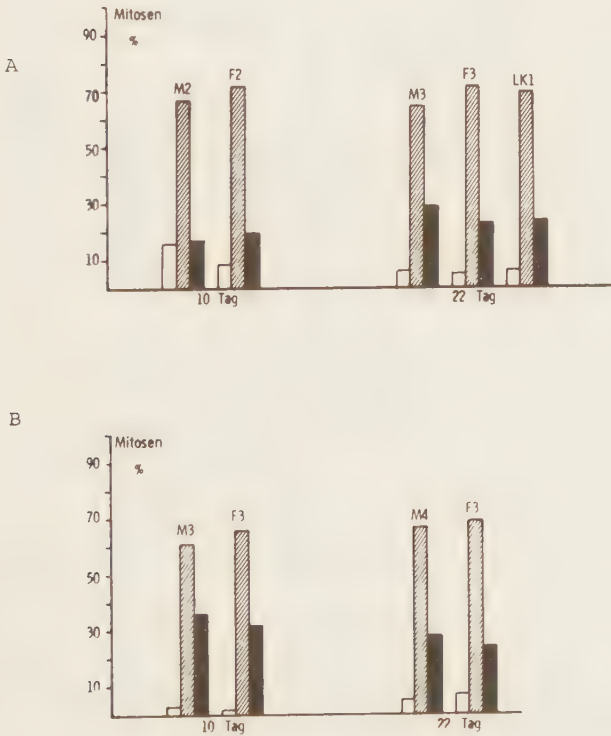


Abb. 6: Chromosomenanalytische Ergebnisse von Versuch II A und II B, s. auch S.21

(in dieser und den folgenden Darstellungen sind die Werte jeweils gemittelt. 'M' steht für Milz, 'F' für Femur, 'H' für Humerus und 'LK' für Lymphknoten. Die Ziffern hinter den Abkürzungen geben an, von wieviel Tieren die Ergebnisse gemittelt wurden. Die weißen Säulen zeigen den T_0 -Anteil, die schraffierten T_6 und die schwarzen T_{66}).

Gewichtsverlauf (s. Abb. 7):

Das Gewicht der Tiere zu Beginn des Versuches betrug 25 g. Nach anfänglicher leichter Gewichtsabnahme, wohl auf Grund der letalen Bestrahlung, nahmen sie wieder zu und erreichten 3 Wochen nach Ersttransplantation annähernd ihr Ausgangsgewicht. Der darauf folgende Gewichtsabfall um 4 g läßt sich aus der Tatsache erklären, daß in der Zwischenzeit 3 relativ schwere Tiere zur Chromosomenanalyse getötet worden waren. Am Ende des Versuches hatten die verbleibenden 3 Tiere (ein relativ leichtes Tier war gestorben) im Vergleich zum Ausgangsgewicht um nahezu 1 g zugenommen.

Ad B) Auch in dieser Gruppe waren 8 Tiere im Versuch. Eines davon starb 1 Tag nach Zweittransplantation an den Folgen einer heparinbedingten abdominellen Blutung. 3 Tiere wurden für die erste Chromosomenanalyse getötet, 4 für die zweite.

Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse vom 10. Tag post transplantationem zeigten ähnlich wie

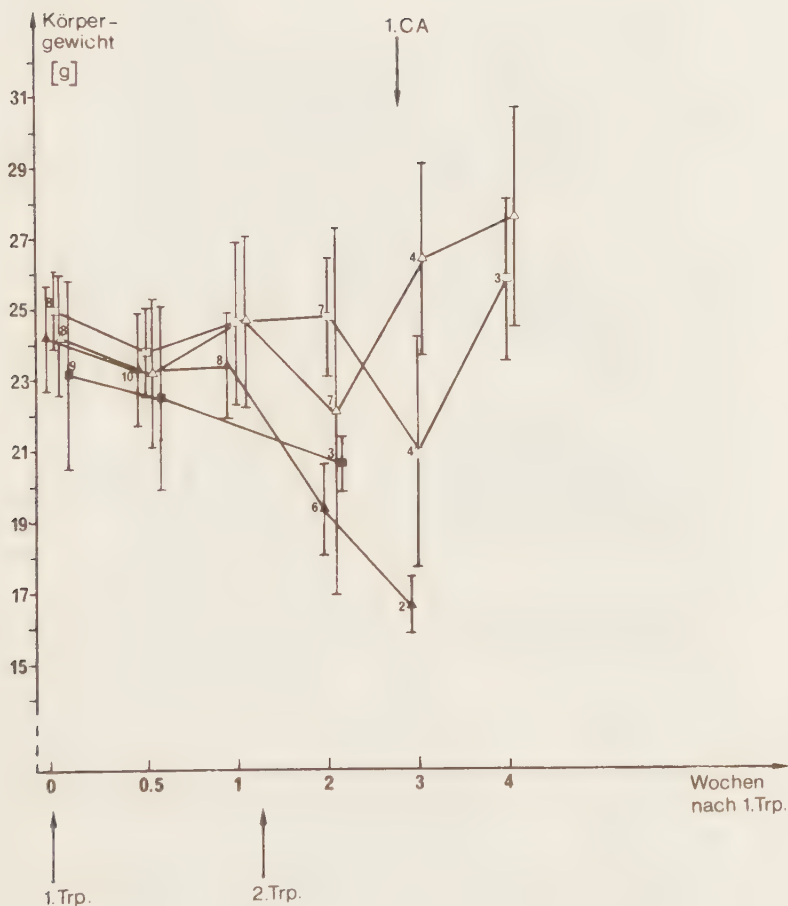


Abb. 7:

Schematische Darstellung des Gewichtsverlaufs zu den Versuchen II A-D. Symbole: □ für A, △ für B, ■ für C, ▲ für D. Die Ziffern geben jeweils die Anzahl der gewogenen Tiere an.

Gruppe A annähernd $2/3$ T_6 - Spenderzellen in Milz und Knochenmark. Dagegen ließ sich mit jeweils über 30% eine stärkere Proliferation der T_{66} -Spenderzellen nachweisen; die Mitoserate der Empfängerzellen lag in der Milz bei 3% und im Knochenmark bei 2%.

22 Tage nach Transplantation war ein geringfügiger Anstieg der Empfänger- und T_6 -Spenderzellen zu verzeichnen. Die T_{66} -Spenderzellen waren in Milz und Knochenmark um jeweils 8% gesunken.

Gewichtsverlauf:

Auch hier ist eine Woche nach Beginn des Versuches ein Absinken des Gewichtes um 1 g gegenüber dem Ausgangsgewicht von 24,3 g zu verzeichnen. Die darauffolgende Gewichtszunahme ist - nach dem Tod eines Tieres - unterbrochen von einer Abnahme um 2,6 g. Nach der Chromosomenanalyse steigt das Gewicht der restlichen 4 Tiere um 3,3 g gegenüber dem Ausgangsgewicht an.

Ad C) Von 9 Tieren starben 6 innerhalb von 7 Tagen nach Zweittransplantation. 2 davon starben möglicherweise an akuter Sekundärkrankheit (Kriterien der Beurteilung s.S. 16); die Todesursache der anderen Tiere konnte aufgrund postmortaler autolytischer Veränderungen nicht festgestellt werden. Die 3 überlebenden Tiere wurden am 10. Tag post transplantationem zur Chromosomenanalyse getötet. (s. Tab. 2).

Tier Nr.	Todes- zeit	Todesursache	Milzgewichte	Bemerkungen	Chromosomenanalytische Ergebnisse		
					T ₀	T ₆	T ₆₆
C	1	12/2	nicht beurteilbar				
	2	13/3	nicht beurteilbar				
	3	15/5	akute SK				
	4	15/5	akute SK				
	5	16/6	unklar				
	6	17/7	nicht beurteilbar				
	7	20/10	C. A.	LK inguinal vergrößert			
			70 mg	LK vergrößert	Milz: Femur: Humerus: 1 - 4	73 56-75% 82	26 18-25% 14
	8	20/10	C. A.	LK vergrößert	Milz: Femur: Humerus: 1 - 4	20-61% 58 35-70%	13-39% 41 13-26%
D	9	20/10	C. A.	LK vergrößert	Milz: Femur: Humerus: 3 2	12-57% 68 67	9-43% 29 31
	1	1/-	heparinbedingte Blutung				
	2	12/2	heparinbedingte Blutung				
	3	20/10	C. A.	LK atrophisch	Milz: Femur: Humerus: 0 2 0	42-84% 75 85	8-16% 23 15
	4	20/10	C. A.	LK inguinal beson- ders deutlich ver- größert	Milz: Femur: Humerus: 0 4-8% 1-4%	23-31% 23-58% 17-68%	52-69% 18-36% 7-28%
	5	20/10	C. A.	LK inguinal beson- ders deutlich ver- größert	Milz: Femur: Humerus: 4 1-1%	68 53-76% -	28 16-23% -
	6	21/11	nicht beurteilbar	kleine Milz			
	7	25/15	akute SK				
	8	26/16	akute SK				

Tab. 2 : Daten zu Versuch II C und II D

An empfangereigenen Zellen waren nur 1 % (Milz), 2 % (Femur) und 4 % (Humerus) nachweisbar. T₆-Spenderzellmitosen lagen mit 73% in Milz und Humerus etwas höher als im Femur (67%). Der Prozentsatz an T₆-Spenderzellen dagegen war mit 31% im Femur am höchsten; in der Milz lag er bei 26%, im Humerus bei 23%. (s. Abb. 8)

An Gewicht nahmen die Tiere stetig ab. Der letzte Wert 3 Wochen nach Versuchsbeginn lag 2,6 g unter dem Ausgangsgewicht.

Ad D) Von den 8 Tieren dieser Gruppe starben innerhalb der ersten 2 Tage nach Zweittransplantation 2 Tiere an den Folgen einer heparinbedingten intraperitonealen Blutung, 3 Tiere wurden für die erste Chromosomenanalyse getötet, die verbliebenen 3 starben am 11. (Todesursache unklar), am 15. und am 16. Tag nach Zweittransplantation (wahrscheinlich an akuter Sekundärkrankheit).

Die Chromosomenanalyse ergab auch hier einen äußerst geringen Anteil an empfangereigenen Zellen (Milz 1%, Femur 4% und Humerus 0%). (s. auch Abb. 8).

Der Abfall der Gewichte war in dieser Gruppe am ausgeprägtesten.

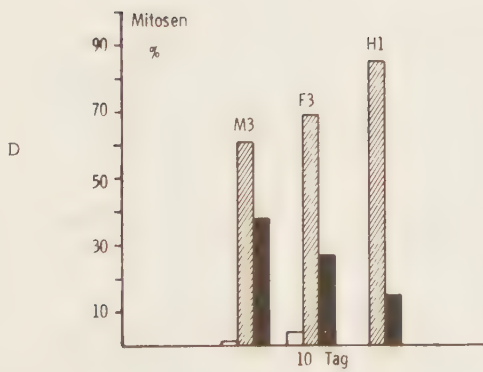
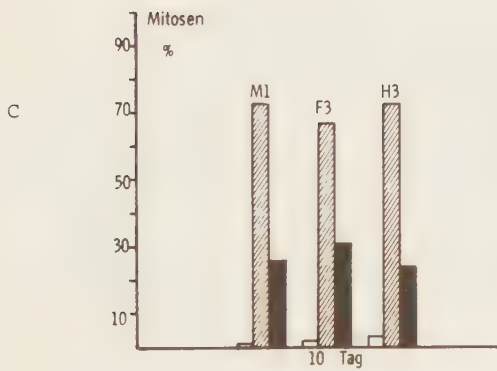


Abb. 8:
Schematische Darstellung der Chromosomenana-
lyse von Versuch II C und D.

III Unterschiedliche Bestrahlungsdosis bei gleichbleibender Zellzahl

Bei diesem Versuch wurden bei der zweiten Transplantation in 3 Gruppen zu jeweils 11 bzw. 10 Tieren 10^8 vorsensibilisierte Zellen gegeben, variiert wurde nur bei der Bestrahlung: Gruppe A wurde vor Transplantation mit 200 r ganzkörperbestrahlt, Gruppe B bekam nur 100 r Ganzkörperbestrahlung und in Gruppe C schließlich wurde transplantiert, ohne daß eine Bestrahlung vorgenommen worden war⁺. (s. Abb. 9)

Außerdem wurde gleichzeitig eine Gruppe von 10 Tieren nach einem gänzlich anderen Schema zur 'Kontrolle' wie folgt behandelt: die letale Ganzkörperbestrahlung von 900 r, sowie die erste Transplantation mit ALS-vorbehandelten Spendern wurden nicht durchgeführt; die Tiere erhielten nur am Tag der 2. Transplantation ohne vorangegangene Bestrahlung 10^8 gegen CBl vorsensibilisierte CBA-T₆₆-Zellen transplantiert (Gruppe D)⁺.

Chromosomenanalysen wurden am 20., 50. und 100. Tag nach Zweittransplantation vorgenommen.

Ad A) Todesursachen der einzelnen Tiere s. Tab. 3. Trotz relativ hoher Milzgewichte, lag nur eine geringe mitotische Aktivität vor (S. Abb. 10 und Tab. 3). Empfängereigene Zellen ließen

+

Im folgenden Text als Gruppe bzw. Versuch III A, III B, III C und III D bezeichnet.

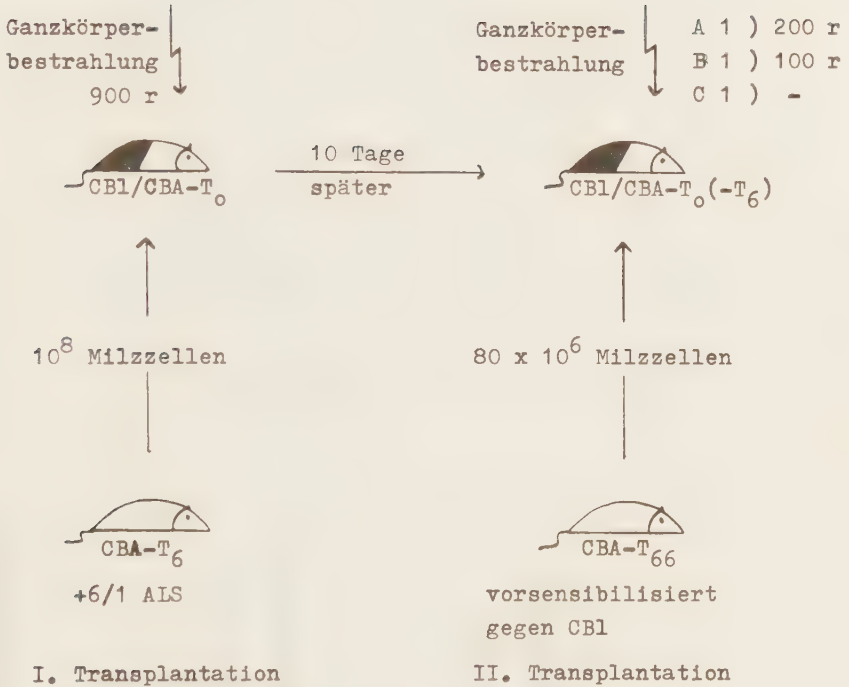


Abb. 9: Schema zu Versuch III A - C.

sich in allen chromosomenanalytischen Untersuchungen - wenn überhaupt - zu höchstens 3% nachweisen. T_6 - waren zu etwa 1/3, T_{66} -Spenderzellen zu etwa 2/3 nachweisbar, wobei sich der Anteil in Milz und Femur nur geringfügig voneinander unterschieden.

Am 50. Tag post transplantationem war der Prozentsatz der T_{66} -Zellen weiter angestiegen, in der Milz etwas ausgeprägter als im Knochenmark⁺. Nur ein Tier konnte 100 Tage nach Transplantation beuntachtet werden; bei ihm fanden sich in der Milz sehr wenig Zellen und keine mitotische Aktivität; im Femur überwoogen bei weitem die T_{66} -Spenderzellen (mit 89% gegenüber 10% T_6).

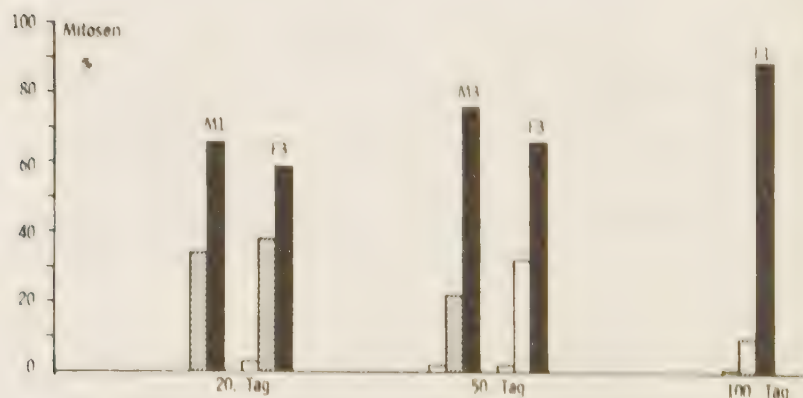


Abb. 10:

Schematische Darstellungen der Chromosomenanalysen von Versuch III A

⁺ s. aber Tab., welche zeigt, daß hier sehr disparate Werte gemittelt wurden

Der Gewichtsverlauf (s. Abb. 11) ist um den Zeitpunkt der zweiten Chromosomenanalyse innerhalb von 2 Wochen um 3,2 g gefallen, steigt danach jedoch stetig an. Das letzte Überlebende Tier wiegt zu Versuchsende mit 23,5 g 2 g mehr als das Ausgangsgewicht der ganzen Gruppe betrug (deren schwerstes 22,9 g wog).

Ad B) Todesursachen s. Tab. 3.

Die Chromosomenanalysen (s. Abb. 12) zeigen, daß auch in dieser Gruppe die empfängereigene Hämoopoese höchstens bei 3% liegt. Am 20. Tag p.t. sind in der Milz fast 20% T_6 - und 80% T_{66} -Spenderzellen nachzuweisen. Im Femur dagegen ist das Ergebnis mit 75% und 22% T_{66} nahezu reziprok. Vergleicht man diesen Sachverhalt mit dem in Gruppe A (wo keine derartige Diskrepanz festzustellen ist), so wird in Erwägung gezogen werden müssen, ob es sich hier um einen Effekt handelt, der auf die unterschiedliche Strahlendosis zurückzuführen ist. Am 50. Tag p.t. proliferierten die T_{66} -Spenderzellen in der Milz bis zu 87% (allerdings fanden sich nur bei 1 Tier Mitosefiguren). Im Knochenmark war der Anteil an T_{66} immerhin auf 60% gestiegen, der an T_6 entsprechend auf 40% gefallen. Die Ergebnisse des 100. Tages sind nicht graphisch dargestellt, da es wenig sinnvoll erschien derart inkohärente Worte dreier Tiere (wie Tabelle 3 zu entnehmen ist) zu mitteln. (s. Abb. 12 auf S. 37)

Tier Nr.	Todes- zeit	Todesursache	Milzgewichte	Bemerkungen	Chromosomenanalytische Ergebnisse			
					Milz: Femur:	T ₀	T ₆	T ₆₀
A 1	30/20	C. A.	90 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	- 2	(8-35% 40	(14-65% 38
2	30/20	C. A.	85 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	- 3	(17-34% 40	(33-66% 57
3	30/20	C. A.	136 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	- 3-3%	(3-33% 27-33%	(6-67% 52-64%
4	34/24	nicht beurteilbar						
5	41/31	nicht beurteilbar						
6	44/34	nicht beurteilbar						
7	50/40	nicht beurteilbar						
8	60/50	C. A.	50 mg		Milz: Femur:	- -	5 4	95 96
9	60/50	C. A.	50 mg		Milz: Femur:	- -	5 42	95 58
10	60/50	C. A.	60 mg		Milz: Femur:	4 3	57 52	30 45
11	110/100	C. A.	56 mg		Milz: Femur:	1 -	10	89
B								
1	11/1	nicht beurteilbar						
2	30/20	C. A.	40 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	1-1% 3	15-22% 76	52-77% 21
3	30/20	C. A.	76 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	1 3	17 74	82 23
4	30/20	C. A.	98 mg	LK atrophisch	Milz: Femur:	- -	8-20% (9-65%	32-80% 4-31%
5	60/50	C. A.	35 mg		Milz: Femur:	- -	- 44	- 56
6	60/50	C. A.	65 mg		Milz: Femur:	- -	- 24	- 76
7	60/50	C. A.	80 mg	LK vergrößert	Milz: Femur:	1 -	12 51	87 49
8	110/100	C. A.	51 mg		Milz: Femur:	- -	- 19	- 81
9	110/100	C. A.	47 mg		Milz: Femur:	- 1	- 97	- 2
10	110/100	C. A.	55 mg		Milz: Femur:	- -	- 37	- 63

Tab. 3: Daten zu Versuch 111 A und 111 B

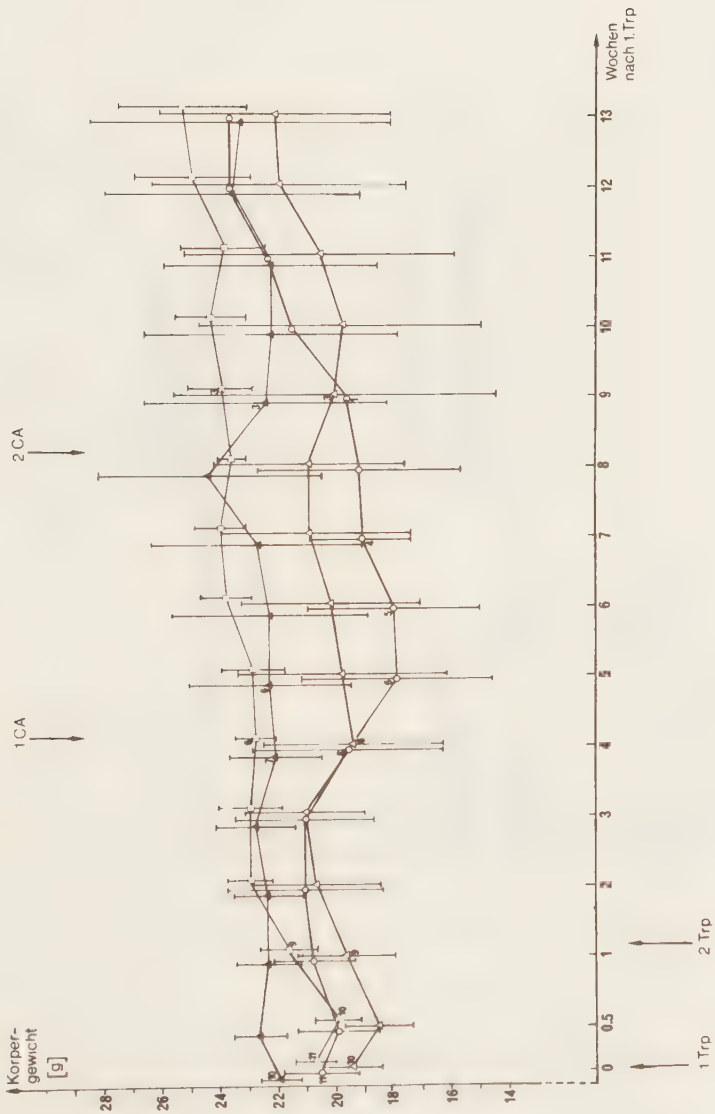


Abb. 11:
Schematische Darstellung des Gewichtsverlaufs
zu den Versuchen III A-D. Symbole: o für A,
△ für B, □ für C und ▲ für D

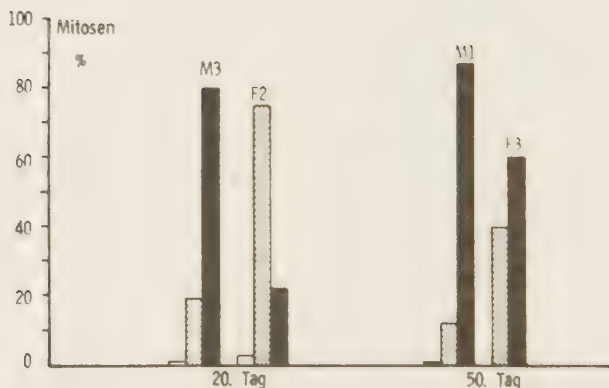


Abb. 12:

Schematische Darstellung der Chromosomenanalysen von Versuch III B.

Der Gewichtsverlauf (Abb. 11) zeigt ein ähnliches Verhalten wie der von Gruppe A, wenngleich trotz niedrigerem Ausgangsgewicht von 19.4 g der Gewichtsabfall schwächer ist. Zum Ende des Versuchs haben die 3 verbliebenen Tiere gegenüber dem Beginn um durchschnittlich 2,5 g zugenommen.

Ad C) ⁺ Todesursachen s. Tab. 4.

Chromosomenanalysen (Abb. 13): Auch in dieser Gruppe liegt eine sehr geringe Proliferation von empfängereigenen Zellen vor. Die Ergebnisse

+

Diese Versuchsanordnung ist mit der von Versuch II B identisch

des 20. Tages p.t. in Milz und Knochenmark differieren beträchtlich: 96% T_{66} -Spenderzellen in der Milz stehen nur 16% im Femur gegenüber. Am 50. Tag p.t. hat sich das Bild dahingehend gewandelt, daß die T_{66} - zugunsten von T_6 -Spenderzellen abnehmen: in der Milz sind nur noch 41% und im Femur 11% T_{66} -Spenderzellen nachweisbar. Am 100. Tag p.t. sind in der Milz keine Mitosen mehr festzustellen, im Femur stehen 3% empfängereigenen 87% T_6 - und 10% T_{66} -Spenderzellen gegenüber.

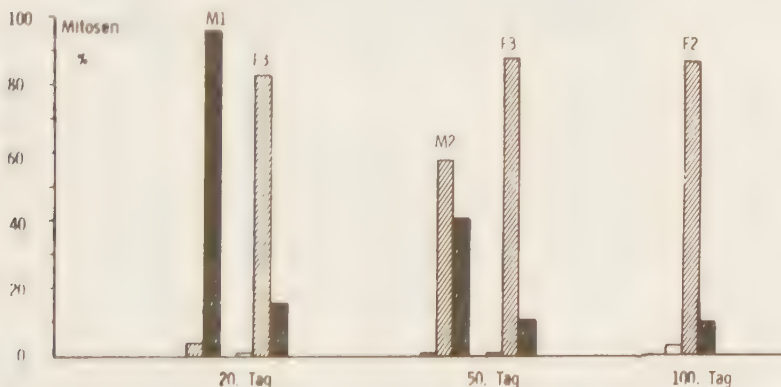


Abb. 13:

Schematische Darstellung der Chromosomenanalysen von Versuch III C.

Wie aus Abbildung 11 zu ersehen ist, nimmt das Gewicht in dieser Gruppe am kontinuierlichsten von 20,7 g auf 25,1 g zu.

Tier Nr.	Todes- zeit	Todesursache	Milzgewichte	Bemerkungen	Chromosomenanalytische Ergebnisse		
					T ₀	T ₆	T ₆₆
C							
1	0/-	Embole nach Transplantation					
2	11/1	nicht beurteilbar					
3	30/20	C.A.	47 mg	LK atrophisch	Milz: Femur: -	67-89%	8-11%
4	30/20	C.A.	55 mg	LK atrophisch	Milz: Femur: 3	(2-8% 76	24-92% 21
5	30/20	C.A.	77 mg	LK atrophisch	Milz: Femur: -	3-4% 34-85%	63-96% 7-17%
6	60/50	C.A.	35 mg		Milz: Femur: -	-	82
7	60/50	C.A.	70 mg		Milz: Femur: 1-3% 2	27-77% 86	7-20% 12
8	60/50	C.A.	50 mg		Milz: Femur: -	20-38% 96	47-62% 4
9	110/100	C.A.	70 mg		Milz: Femur: -	-	88
10	110/100	C.A.	50 mg		Milz: Femur: -	(22-56, 5% 17-43, 5%)	-
11	110/100	C.A.	74 mg		Milz: Femur: 5	-	86
D							
1	30/20	C.A.	100 mg	LK vergrößert	Milz: Femur: 51-80% 78		13-20% 22
2	30/20	C.A.	273 mg	LK atrophisch	Milz: Femur: 7 97		93 3
3	30/20	C.A.	222 mg	LK atrophisch	Milz: Femur: 86 82		14 18
4	39/29	nicht beurteilbar					
5	60/50	C.A.	85 mg		Milz: Femur: (19-83% 97 2)		4-17% 3 2)
6	60/50	C.A.	95 mg		Milz: Femur: (42-86% 98 21)		7-14% 2 1)
7	60/50	C.A.	70 mg		Milz: Femur: (20 85 13)		-) 2) -)
8	110/100	Pneumonie		Milz stark vergrößert			
9	110/100	C.A.	137 mg		Milz: Femur: 93		7
10	110/100	C.A.	136 mg		Milz: Femur: 43-85%		8-15%

Tab. 4: Daten zu Versuch III C und III D

Ad D) Zeitpunkt und Ursache des Todes sind aus Tab. 4 ersichtlich. (Versuchsschema s. Abb.15)

20 Tage p.t. sind in der Milz 58% Empfänger- und 42% Spenderzellen feststellbar; im Knochenmark konnten die Spenderzellen mit nur 14% in weit geringerem Maße proliferieren. 50 Tage p.t. ist die Proliferationsrate der Spenderzellen in der Milz auf 14% abgesunken, im Knochenmark gar auf 2%. Am 100. Tag p.t. liegt in der Milz trotz hoher Gewichte neben geringer Zellzahl keine mitotische Aktivität mehr vor; im Knochenmark sind die Spenderzellen mit 11% vertreten (s. Abb. 13)

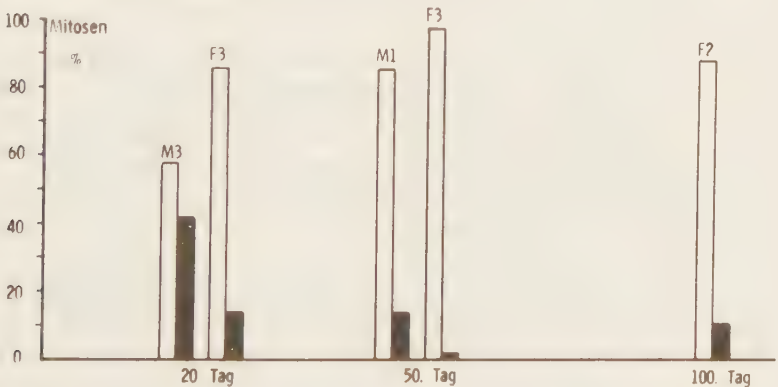


Abb. 14:

Schematische Darstellung der Chromosomenanalysen von Versuch III D

Der Gewichtsverlauf (Abb. 11) läßt zunächst einmal, da nicht bestrahlt wurde, die typische Abnahme vermissen, bleibt dann über rund 8 Wochen

nahezu konstant, steigt darauf innerhalb einer Woche um fast 2 g, um anschließend ebenso deutlich zu fallen (was dadurch bedingt ist, daß für die Chromosomenanalyse relativ schwere Tiere aus dem Versuch genommen wurden). Bis zum Versuchsende steigt das Gewicht insgesamt wieder leicht an.

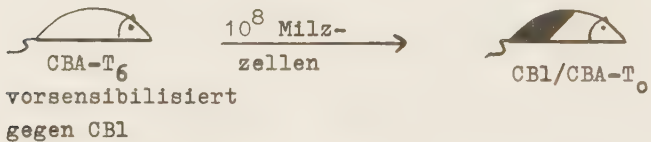


Abb. 15: Schema zu Versuch III D

IV Unterschiedliche Bestrahlung bei gleichbleibender Zellzahl mit Kontrollgruppen

6 Gruppen mit jeweils 9 bzw. 8 (in Gruppe C1) Tieren befanden sich in diesem Versuch. Es wurde nach demselben Schema wie in den Versuchen III A-C vorgegangen:

- A 1 : 200 r Ganzkörperbestrahlung vor Zweittransplantation, Transplantation von 80×10^6 Milzzellen⁺ (s. Abb. 16),
- A 2: Als Kontrollgruppe zu A 1 wurden zum Empfänger syngene, ALS-vorgehandelte CBL/CBA - T₆-Milzzellen gegeben. Bei der Zweittransplantation wurde wie in A 1 verfahren. (s. Abb. 17)
- B 1 : 100 r Ganzkörperbestrahlung vor Zweittransplantation, Transplantation von 80×10^6 Milzzellen⁺ (s. Abb. 16)

+ Fußnote s. S. 44

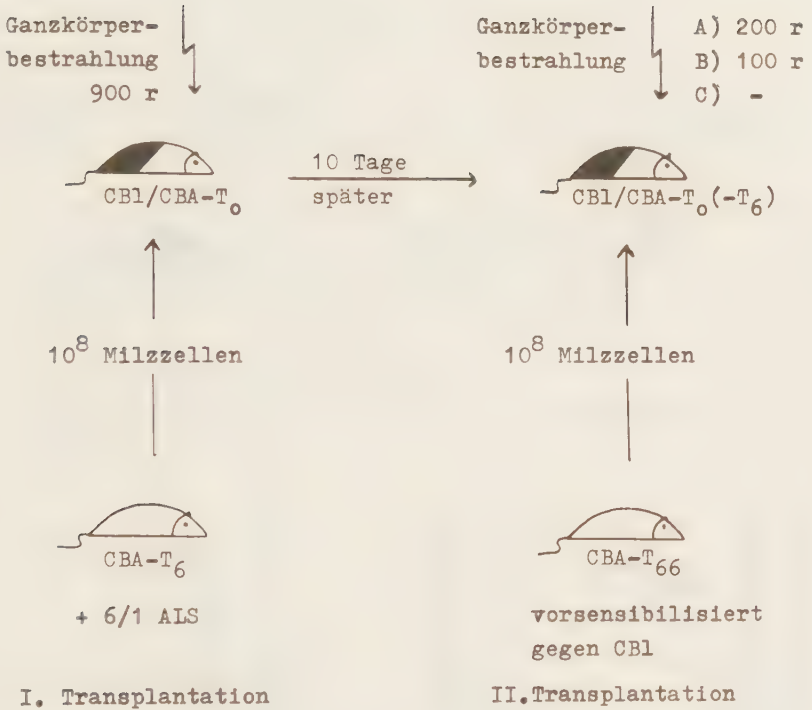


Abb. 16:

Schema zu den Versuchen IV A 1, B 1, C 1

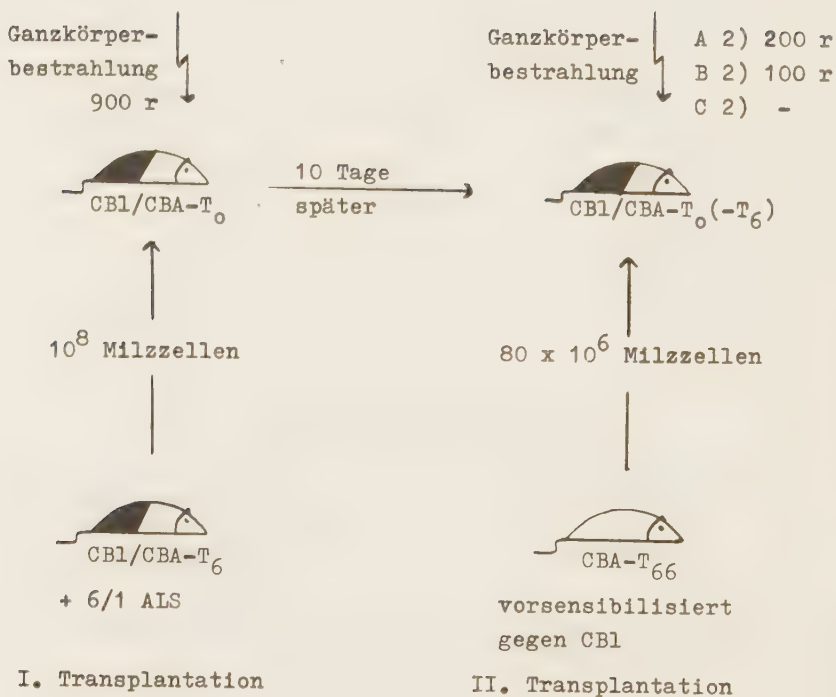


Abb. 17:

Schema zu den Versuchen IV A 2, B 2, C 2

- B 2 : Ersttransplantation wie A 2; Zweittransplantation wie B 1. (s. Abb. 17)
- C 1 : Keine Bestrahlung vor Zweittransplantation, Transplantation von 80×10^6 Milzzellen⁺ (s. Abb. 16)
- C 2 : Ersttransplantation wie A 2; Zweittransplantation wie C 1⁺⁺. (s. Abb. 17)

Ad A 1: Todeszeit und -ursache finden sich in Tab. 5. Chromosomenanalysen (s. Abb. 18): Wie aus den Abb. 18 und folgenden zu entnehmen ist, lassen sich in dieser Gruppe wie in allen anderen auch, nur sehr geringe (maximal 3%) Anteile an oder gar keine Empfängerzellen nachweisen.

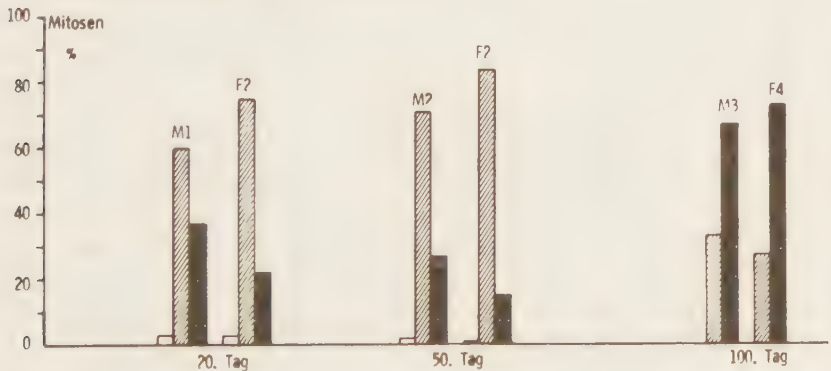


Abb. 18:

Schematische Darstellung der Chromosomenanalysen zu Versuch IV A 1

⁺
Die für die Zweittransplantation beabsichtigte Zellzahl von 100×10^6 , mußte auf 80×10^6 Zellen reduziert werden, da aus den Milzen der vorsensibilisierten Tiere nicht mehr Zellen gewonnen werden konnten. Im Bereich dieser hohen Zellzahlen dürfte dies jedoch ohne methodischen Belang sein.

⁺⁺

Im folgenden Text als Gruppe bzw. Versuch IV A 1, A 2, B 1, B 2, C 1 und C 2 bezeichnet

Tier Nr.	Todes- zeit	Todesursache	Milzgewichte	Bemerkungen	Chromosomenanalytische Ergebnisse		
					T ₀	T ₆	T ₆₆
A ₁	1	24/14					
	2	30/20	unklar				
	3	30/20	50 mg		Milz: Femur: 2-3% 3	39-60% 73	24-37% 24
	4	60/50	43 mg		Milz: Femur: (-) 3	12-63% 78	7-37% 19
	5	60/50	65 mg		Milz: Femur: 4 -	80 87	16 13
	6	110/100	55 mg		Milz: Femur: 1 1	61 81	38 18
	7	110/100	35 mg		Milz: Femur: (-) -	5-23% 12-20%	17-77% 47-80%
	8	110/100	42 mg		Milz: Femur: - -	5-20% 10	20-80% 90
	9	110/100	60 mg		Milz: Femur: - -	11-55% 40	9-45% 60
A ₂	1	1/-	50 mg		Milz: Femur: (-) -	1-14% 25-38%	6-86% 41-62%
	2	23/13	heparinbedingte Blutung				
	3	28/18	nicht beurteilbar				
	4	30/20	unklar				
	5	30/20	50 mg		Milz: Femur: - -	2-10% 6	18-90% 94
	6	38/28	80 mg		Milz: Femur: - -	3-6, 5% 5	43-93, 5% 95
	7	52/42	nicht beurteilbar				
	8	60/50	Pneumonie				
	9	60/50	49 mg		Milz: Femur: - -	12-30% 8	28-70% 92
A ₂	1	60/50	50 mg		Milz: Femur: (-) -	3-12% 9	22-88% 91
	2	60/50	C. A.				

Tab. 5: Daten zu Versuch IV A₁ und IV A₂

Am 20. Tag p.t. überwiegen die T_{66} - gegenüber den T_{66} -Spenderzellen im Knochenmark ausgeprägter als in der Milz. Diese Verhältnisse sind am 50. Tag p.t. noch deutlicher. Dagegen zeigt der 100. Tag p.t. eine Umkehrung: nun liegt die Proliferation von T_{66} -Spenderzellen im Bereich von 70%, auch hier im Knochenmark ausgeprägter als in der Milz.

Die Gewichte (s. Abb. 20) steigen im Prinzip bis zur zweiten Chromosomenanalyse an, fallen zu diesem Zeitpunkt, da 2 schwere Tiere für die Untersuchung getötet wurden, steigen schließlich wieder und verlaufen über 6 Wochen bis zum Ende des Versuches in etwa konstant. Eine leichte Gewichtszunahme ist gegenüber dem Versuchsbeginn festzustellen.

Ad A 2 (Kontrolle zu A 1): Todeszeit und -ursache s. Tab. 5.

Chromosomenanalysen (s. Abb. 19): 20 Tage p.t. finden sich sowohl in der Milz als auch im Knochenmark über 90% T_{66} -Spenderzellen. Die zweite Chromosomenanalyse zeigt für das Knochenmark ein nahezu unverändertes Ergebnis; in der Milz proliferierten die T_{66} -Spenderzellen nicht mehr ganz so stark.

Der für die Sekundärkrankheit typische Gewichtsverlust geht aus Abb. 20 hervor.

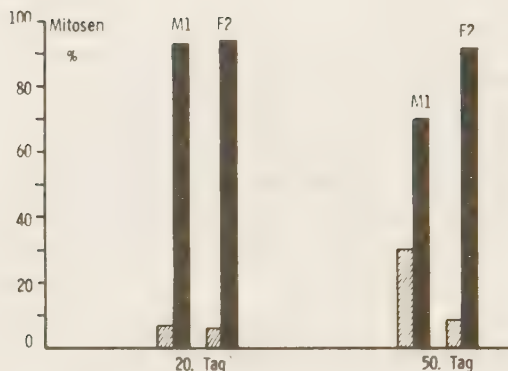


Abb. 19:

Schematische Darstellung der Chromosomenanalysen zu Versuch IV A 2.

Ad B 1: Tab. 6 gibt Todeszeit und -ursache wieder.

Chromosomenanalysen (s. Abb. 22 und Tab. 6): Auch in dieser Gruppe mit 100 r Ganzkörperbestrahlung vor Zweittransplantation überwiegen die T_6 -Spenderzellen (wie in A 1 und C 1). Am 20. Tag p.t. mit über 80% in Milz und 91% in Knochenmark. S. Abb. 22.

Für den 50. Tag p.t. zeigt die graphische Darstellung zwar für T_6 - und T_{66} -Spenderzellen eine beinahe gleich große Proliferationsrate, ein Blick auf die Tabelle läßt jedoch erkennen, daß hier die Ergebnisse von 2 Tieren gemittelt wurden, die sich annähernd reziprok verhielten. Am 100. Tag p.t. liegt der Anteil an T_6 -

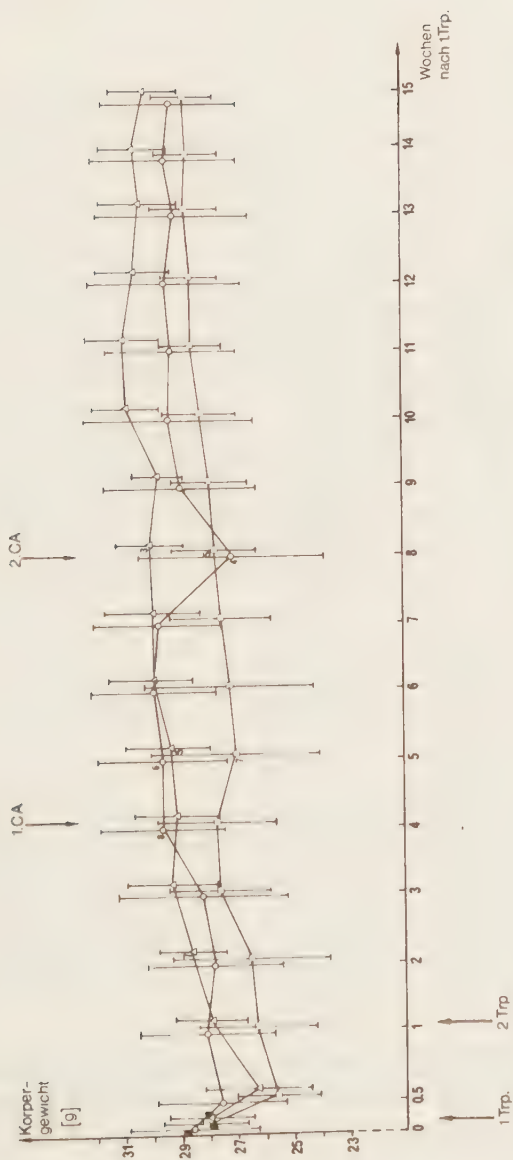


Abb. 2o: Schematische Darstellung des Gewichtsverlaufs zu Versuch IV A 1, B1 und C 1. Symbole: o für A, □ für B, △ für C

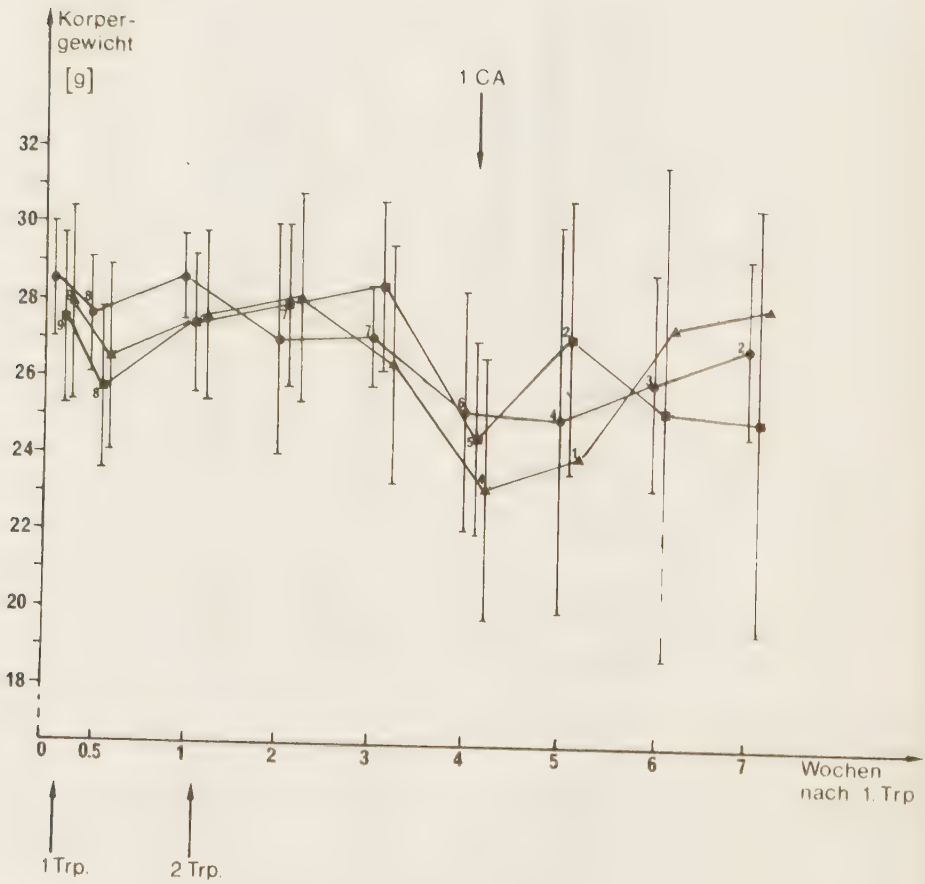


Abb. 21:

Schematische Darstellung des Gewichtsverlaufs zu Versuch IV A 2, B 2 und C 2. Symbole: ● für A 2, ■ für B 2, ▲ für C 2

Spenderzellen wieder über 70%. In den Milzpräparaten fanden sich zwar reichlich Zellen, jedoch kaum Mitosefiguren.

Gewicht (Abb. 20): Die Ganzkörperbestrahlung führte zunächst zu einer Abnahme von rund 2,5 g. Danach beginnt ein im wesentlichen kontinuierlicher, leichter Anstieg. Zu Versuchsende haben die 5 verbliebenen Tiere gegenüber dem Beginn um 0,5 g zugenommen.

Ad B 2 (Kontrolle zu B 1): Todeszeit und-ursache s. Tab. 6.

Chromosomenanalysen (s. Abb. 23 und Tab. 6): Die Untersuchungen ergeben auch hier fast 100 % T_{66} -Spenderzellen. Dies sowohl am 20. als auch am 50. Tag post transplantationem. Der Gewichtsverlauf (Abb. 21) ist äußerst unstetig und weist zu Versuchsende gegenüber dem Beginn eine Abnahme von mehr als 2 g auf.

Ad C 1 (keine Bestrahlung vor Zweittransplantation): Todeszeit und Ursache s. Tab. 7.

Chromosomenanalysen (Abb. 24 und Tab. 7): Ähnlich wie in den entsprechenden Gruppen liegen hier die Anteile proliferierender T_6 -Spenderzellen über 80% in der Milz (bei allen 3 Untersuchungen), im Knochenmark von 94% (am 20. Tag p.t.) auf 87% (am 100. Tag p.t.) leicht fallend.

Das Gewicht der Tiere (Abb. 16) steigt - nach anfänglicher Abnahme um fast 2 g - bis zum Ende des Versuchs um rund 2 g über das Ausgangsgewicht.

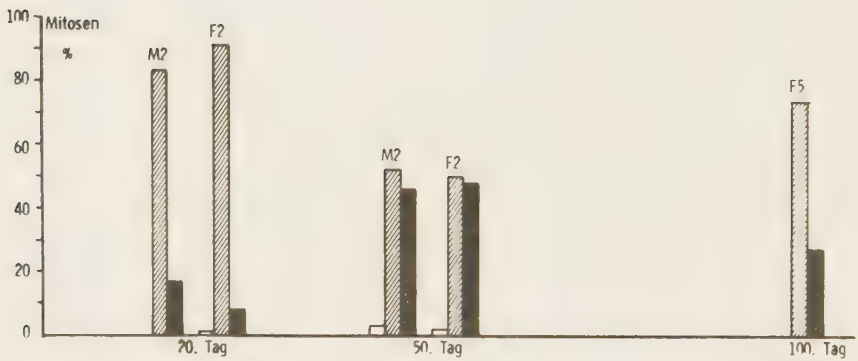


Abb. 22:
Schematische Darstellung der Chromosomenana-
lysen zu Versuch IV B 1

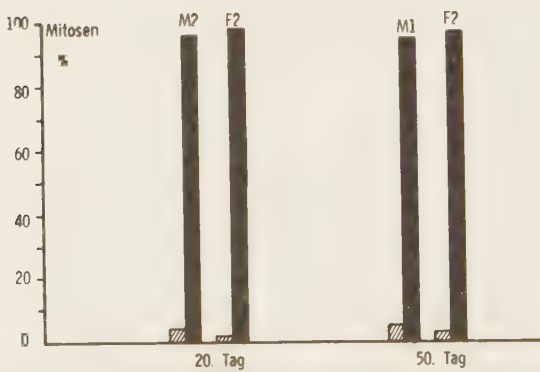


Abb. 23:
Schematische Darstellung der Chromosomenanaly-
sen zu Versuch IV B 2.

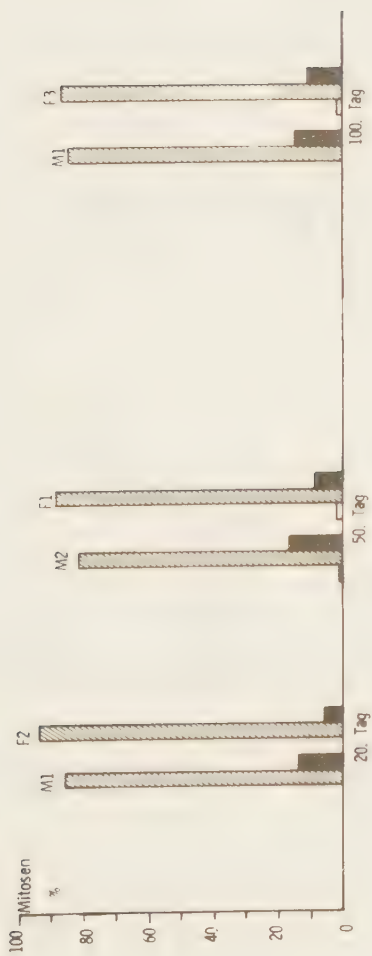


Abb. 24: Schematische Darstellung der Chromosomenanalysen zu Versuch
IV C 1.

								T ₀	T ₆	T ₆₆
B₁										
B ₁	1	30/20	C. A.	55 mg		Milz: Femur: -	-	89 94	11 6	
	2	30/20	C. A.	55 mg		Milz: Femur: -	-	77 88	23 11	
	3	60/50	C. A.	50 mg		Milz: Femur: 3-5%	3	47-85% 87	5-10% 10	
	4	60/50	C. A.	60 mg		Milz: Femur: -	-	12-19% 13	52-81% 87	
	5	110/100	C. A.	50 mg		Milz: Femur: (-	-	2 41-82%	2) 9-18%	
	6	110/100	C. A.	66 mg		Milz: Femur: (-	-	10-83% 56	2-17% 44	
	7	110/100	C. A.	60 mg		Milz: Femur: (-	-	11-79% 67	3-21% 33	
	8	110/100	C. A.	59 mg		Milz: Femur: (-	-	11-85% 77	2-15% 22	
	9	110/100	C. A.	59 mg		Milz: Femur: (-	-	4 82	2) 18	
B₂										
B ₂	1	1/-	heparinbedingte Blutung			Milz: Femur: -	-	5 1	95 99	
	2	11/1	heparinbedingte Blutung			Milz: Femur: -	-	2 2	98 98	
	3	28/18	Pneumonie							
	4	30/20	C. A.	50 mg		Milz: Femur: -	-			
	5	30/20	C. A.	80 mg		Milz: Femur: -	-			
	6	30/20	unklar							
	7	32/22	nichtbeurteilbar							
	8	60/50	C. A.	58 mg		Milz: Femur: -	-	5 3	95 97	
	9	60/50	C. A.	48 mg		Milz: Femur: (-	-	2-8% 3	24-92% 97	

Tab. 6.: Daten zu Versuch IV B₁ und IV B₂

Tier Nr.	Todes- zeit	Todesursache	Milzgewichte	Bemerkungen	Chromosomenanalytische Ergebnisse		
					T ₀	T ₆	T ₆₆
C ₁	1	10/0		heparinbedingte Blutung			
	2	30/20	65 mg	C.A.	Milz: Femur: -	70-86% 95	12-14% 5
	3	30/20	45 mg	C.A.	Milz: Femur: -	9 92	2) 8
	4	60/50	56 mg	C.A.	Milz: Femur: 1-2% 2	33-79% 89	8-19% 9
	5	60/50	61 mg	C.A.	Milz: Femur: -	35-85% 3	6-15% 1)
	6	110/100	50 mg	C.A.	Milz: Femur: -	21-78% 71-87%	6-12% 11-13%
	7	110/100	67 mg	C.A.	Milz: Femur: 2	35-85% 87	6-15% 11
	8	110/100	73 mg	C.A.	Milz: Femur: 1-2	28-90% 88	3-10% 10
C ₂	1	25/15		nicht beurteilbar			
	2	25/15		nicht beurteilbar			
	3	27/17		fraglich SK			
	4	28/18		fraglich SK			
	5	29/19		unklar			
	6	30/20	100 mg	C.A.	Milz: Femur: -	2 7	98 93
	7	30/20	60 mg	C.A.	Milz: Femur: -	3 3	87 95
	8	30/20		unklar			
	9	60/50	40 mg	C.A.	Milz: Femur: -	4-5% 1	71-95% 99

Tab 7.: Daten zu Versuch IV C₁ und IV C₂

Ad C 2 (Kontrolle zu C 1): Todeszeit und-ur-
sache s. Tab. 7.

Die Ergebnisse der Chromosomenanalysen (Abb.
25 und Tab. 7) sind fast dieselben wie in Grup-
pe B 2.

Der Gewichtsverlauf (Abb. 21) weist bis zum
20. Tag p.t. eine Abnahme um fast 5 g auf.
Der darauffolgende steile Anstieg ist insofern
nicht charakteristisch, als nur noch 1 Tier
im Versuch ist.

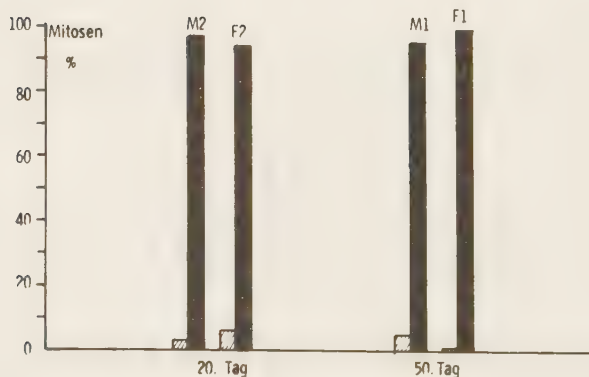


Abb. 25
Schematische Darstellung der Chromosomenanalysen
zu Versuch IV C 2

DISKUSSION

Für eine erfolgreiche Transplantation hämopoetischer Zellen müssen wenigstens drei Vorbedingungen gewährleistet sein: 1. 'Raum' für transplantierte Zellen, 2. eine ausreichende Zellmenge vom Spender, sowie 3. eine möglichst große genetische Ähnlichkeit zwischen Empfänger und Spender. Was den 'Raum' anlangt, so läßt er sich durch Bestrahlung mit entsprechend hohen Dosen schaffen; andererseits zwingt eine letale Bestrahlung zur Transplantation, da andernfalls eine 'Primärkrankheit', auch als 'bone marrow syndrome' bezeichnet, die Folge wäre: aufgrund der Bestrahlung kommt es zunächst zu einer Hemmung der zellulären Proliferation in den hämopoetischen Geweben und damit konsekutiv zum Untergang des hämopoetischen Systems. Bei Mäusen führt dies innerhalb einiger Tage zur Granulocytopenie, was über eine Schwächung der Infektabwehr bei vielen Tieren Sepsis und Bakteriämie zur Folge hat. Die nach längstens einer Woche auftretende Thrombocytopenie bedingt eine hämorrhagische Diathese, was zusammen mit der fehlenden Neubildung von Erythrozyten zu ausgeprägter Anämie führt (24). Eine genügend hohe Zellzahl zu transplantieren dürfte am wenigsten schwierig sein. Die größten Probleme liegen darin, vom immungenetischen Standpunkt aus den richtigen Spender zu finden. Wo Spender und Empfänger genetisch identisch sind, ist die Transplantation problemlos. Sind sie nicht miteinander

der identisch, dann können sowohl host-versus-graft- als auch graft-versus-host-Reaktion auftreten.

Die host-versus-graft-Reaktion kann nur dann ablaufen, wenn noch immunkompetente Empfängerzellen vorhanden sind; man sucht dies durch entsprechend hohe Strahlendosen zu vermeiden. Liegt die Dosis zu niedrig, so kann es, wie der "middlethal dose effect" zeigt, zu einer host-versus-graft-Reaktion kommen, die zur akuten Abstoßung des Transplantates führt und für den Empfänger tödlich ist. Liegt die Strahlendosis wesentlich zu hoch, so kommt es zur irreversiblen Schädigung des Darms. Eine andere Möglichkeit zur Verhinderung der host-versus-graft-Reaktion liegt in der Vorbehandlung des Empfängers mit ALS und Reduktion der Strahlendosis (8).

Der Ablauf einer graft-versus-host-Reaktion ist beim Empfänger von einer Sekundärkrankheit begleitet, an der er möglicherweise zugrunde geht. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte nicht von vornherein erwartet werden, daß auch die Zweittransplantatzellen gegen den Empfänger tolerant seien, es hätte ebenso gut zu einer graft-versus-host-Reaktion der vorsensibilisierten Zweittransplantatzellen kommen können. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist je nach transplantierte Zellart - ob Knochenmark- oder Milzzellen - zwischen chronischer und akuter Sekundärkrankheit zu unterscheiden. In den hier

durchgeführten Versuchen wurden immer Milzzellen übertragen, es hätte also durchaus eine akute Sekundärkrankheit ablaufen können. Daß Milzzellen überhaupt zur Restitution der Hämo-poese des Empfängers geeignet sind, liegt in der Tatsache begründet, daß ihr Anteil an hämo-poetischen oder Stammzellen ca. 10% verglichen mit Knochenmark beträgt (9, 10). Von Bedeutung für die graft-versus-host-Reaktion dürfte allerdings der Sachverhalt sein, daß der Gehalt an Theta-Antigen tragenden CBA-Milzzellen bei 35-50% liegt (9).

Versuche, die graft-versus-host-Reaktion zu vermeiden, lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten einteilen. Eine Möglichkeit wäre die, danach zu unterscheiden, ob der Empfänger oder der Spender behandelt wird, eine andere wäre die, nach dem Zeitpunkt, ob nämlich vor, während oder nach der Transplantation auf den Spender oder den Empfänger Einfluß genommen wird (z.B. durch Bestrahlung oder Thymektomie), wieder eine andere, ob in vivo- (z.B. mittels ALS-Behandlung) oder in vitro- (z.B. durch Absorption von Spenderzellen mit spezifischen Seren) Verfahren angewandt werden. Die Möglichkeiten sind in verschiedenen Systemen bedauerlicherweise verschieden brauchbar. So wird sich die Spendervorbehandlung in den meisten Fällen im humanen System verbieten. Im Mäusesystem ist sie dagegen mit gutem Erfolg praktiziert worden. In vitro Versuche - nach Gewinnung der Spender-

zellen -, die sich tierexperimentell bewährt haben, wären besonders für die Anwendung beim Menschen geeignet. Hier sind Versuche zu erwähnen, wie die von Dicke et al. (11), denen es gelang, mit physikalischen Methoden eine Separierung von Stammzellen von T-Lymphozyten zu erreichen. Auch über eine Beeinflussung der Sekundärkrankheit durch Lagerung der Spenderzellen bei verschiedenen Temperaturen wurde berichtet (12). Über eine Unterdrückung der graft-versus-host-Reaktion im semiallogenen Mäuse-system (Transplantation von Parentalzellen auf die F₁-Filialgeneration) berichten RÖDT et al. (13); sie hatten Erfolg mit der in vitro Inkubation von Spenderzellinokulat in absorbier - tem T-zellspezifischen-Antilymphozyten-Globulin. Von keimfrei gehaltenen Mäusen überlebten 98% den 120. Tag. nach allogener Knochenmarks-transplantation, allerdings in einem schwächeren System; graft-versus-host-Aktivität war jedoch histologisch noch nachweisbar (25). v.BECKUM et al. (26) bestrahlten keimfreie Mäuse letal und transplantierten Rattenknochenmark; die graft-versus-host-Reaktion konnte dadurch zwar nicht verhindert werden, lief aber ohne entzündliche Veränderungen ab.

Maßnahmen zur Vermeidung der graft-versus-host-Reaktion vor der Transplantation, die sich mit der Bestrahlung des Spenders beschäftigten, erwiesen sich als wenig sinnvoll, wohl weil die Stammzellen zu strahlensensibel sind (14) und

die angewandten Strahlendosen nicht alle T-Lymphozyten erfassen würden. Versuche mit ALS wurden in verschiedenen Systemen mit wechselndem Erfolg durchgeführt. Bei Hunden (27) oder bei Affen (28) beispielsweise erwies sich die Spenderbehandlung mit ALS als wenig wirkungsvoll. Immerhin konnte ALS-Spendervorbehandlung das Auftreten von Sekundärkrankheit bei stark H_2 -inkompatiblen Mäusestämmen verzögern (15, 16). Eine signifikant bessere Verzögerung der Sekundärkrankheit konnte auch mit Spendervorbehandlung mit ALS und Hammelerythrozyten, sowie Thymektomie und ALS gegenüber alleiniger Gabe von ALS erreicht werden (15). Eine nahezu vollständige Unterbindung der Sekundärkrankheit ist mit alleiniger ALS-Vorbehandlung des Spenders bei der Transplantation von parentalen Milzzellen in F_1 -Hybriden möglich (10, 17).

Daß die Spenderbehandlung mit ALS in der Tat im semiallogenen System unter Verwendung parentaler Spenderzellen zur Vermeidung der Sekundärkrankheit führt, zeigen vor allem die Versuche I, II A und B, in denen ohne Bestrahlung vor der Zweittransplantation $10^5 - 10^8$ Milzzellen transplantiert wurden (s. auch Schemazeichnung Abb. 3). Auch die Zweittransplantation von gegen CBl vorsensibilisierten CBA-Zellen führt nicht zum klinischen Bild der Sekundärkrankheit. Ob hier das Fehlen der Bestrahlung vor der zweiten Transplantation eine Rolle spielt, ist fraglich, denn auch ohne Be-

strahlung sind immerhin rund 25% der Zweittransplantatzellen am 22. Tag p.t. in den untersuchten Geweben nachweisbar (Abb. 6).

Die Modifikation in den Versuchen II C und D (s. auch Schemazeichnung Abb. 5), in denen die Tiere einer Teilkörperbestrahlung von 500 r unterworfen wurden, zeigt erheblich kürzere Überlebenszeiten als ohne Bestrahlung oder Gruppen mit geringerer Ganzkörperbestrahlung. Keines der teilkörperbestrahlten Tiere lebte bis zum 20. Tag, so daß nur am 10. Tag p.t. Chromosomenanalysen vorgenommen werden konnten. Die Zellproliferation der Zweitspender liegt nur leicht über der der unbestrahlten Vergleichsgruppen. Der Gewichtsverlauf zeigt hingegen ein rasches Abnehmen der bestrahlten Tiere (Abb. 7). In der nicht bestrahlten vorderen Körperhälfte finden sich kaum mehr Zweitspenderzellen, als in der hinteren. Der Gewichtsverlauf und ein Teil der autoptischen Befunde legen zwar den Gedanken an das Auftreten von Sekundärkrankheit nahe, die chromosomenanalytischen Befunde lassen aber eher darauf schließen, daß die zusätzliche Bestrahlung von 500 r zum Tod der Tiere geführt hat.

Die wenig Erfolg versprechenden Ergebnisse mit der Teilkörperbestrahlung führten zur Änderung des Versuchsmodus, so daß eine Ganzkörperbestrahlung bei niedrigerer Dosis vorgenommen wurde. Auf die Bestrahlung wurde deshalb nicht ganz

verzichtet, weil die Überlegung, daß für die Spenderzellen des Zweittransplantates ein gewisser Proliferationsraum geschaffen werden müsse, nicht ohne Bedeutung schien. Tatsächlich zeigt der Vergleich der Proliferationsrate der Zweittransplantationszellen mit der Strahlendosis in den Gruppen III A bis C⁺ eine direkte Abhängigkeit derart, daß um so mehr T₆₆-Spenderzellen nachweisbar waren, je höher die Strahlendosis war. Die Gruppe mit 100 r Bestrahlung läßt sich deshalb nicht ganz einordnen, weil hier einzelne Tiere einen recht verschiedenen Grad von Chimärismus aufweisen (s. Tab. 3). Trotz der teilweise sehr hohen Proliferationsrate der gegen CBl vorsensibilisierten T₆₆-Spenderzellen des Zweittransplantates, vor allem nach 200 r, erkrankten die Tiere anscheinend nicht an Sekundärkrankheit (s. dazu auch den Gewichtsverlauf in Abb. 11). Es konnte auch nicht nachgewiesen werden, daß die 4 in Gruppe III A (mit 200 r Ganzkörperbestrahlung) verstorbenen Tiere (s. Tab. 3) an Sekundärkrankheit gelitten hatten, da sich dies in der entsprechenden Gruppe IV A nicht wiederholt hat.

⁺Es handelt sich um die Gruppen III A mit 200 r Ganzkörperbestrahlung, III B mit 100 r Ganzkörperbestrahlung und III C ohne Bestrahlung vor Zweittransplantation von 10⁸ Milzzellen; s. dazu auch Schemazeichnung Abb. 9, sowie Abb. 10, 12 und 13 zu den Chromosomenanalysen.

Die in Versuch III D durchgeführte "Kontrolle" (s. Schemazeichnung Abb. 15), in der die sonst vorgenommene Ersttransplantation wegfiel und zum Zeitpunkt der Zweittransplantation ohne Bestrahlung gegen CBl vorsensibilisierte Parentalzellen übertragen wurden, zeigt, daß dem Transplantat offenbar der Proliferationsraum fehlt.

Die Gruppen IV A 1, B 1 und C 1 (variierte Zweitbestrahlung von 200 r in A 1, 100 r in B 1 und keiner Bestrahlung in C 1, s. dazu auch Abb. 16) bestätigen die bereits diskutierten Ergebnisse der Gruppen III A bis C. Auch hier bildet allerdings die Gruppe IV B 1 (Zweitbestrahlung 100 r) insofern eine Ausnahme, daß am 50. Tag immerhin 1 Tier mit einer hohen T_{66} -Spenderzellproliferationsrate im Versuch war (s. Tab. 6).

Die Kontrollgruppen IV A 2, B 2 und C 2 (Variation bei der Ersttransplantation s. Abb. 17), die ja im eigentlichen Sinne keine Chimären sind, da sie syngen transplantiert wurden, weisen eine wesentlich kürzere Überlebenszeit auf als die anderen Gruppen. Vergleicht man IV A 2 (syngenes Ersttransplantat) mit IV A 1 (semiallogenes Ersttransplantat, beide nach 200 r Ganzkörperbestrahlung parentales Zweittransplantat), so fällt zunächst die wesentlich größere T_{66} -Proliferationsrate in A 2 auf (Abb. 18 und 19). Überlebenszeiten und Gewichtsverlauf lassen den Schluß zu, daß hier die Proliferation von T_{66} -Zweittransplantatzellen mit dem Ablauf einer

graft-versus-host-Reaktion verbunden ist. In der Kontrollgruppe (100 r Ganzkörperbestrahlung vor Zweittransplantation) wird dieser Vorgang noch deutlicher; wie Abb 23 zeigt, sind hier T_{66} -Spenderzellen mit über 90% vertreten. Auch in Gruppe IV C 2 (keine Bestrahlung vor Zweittransplantation) liegt Analoges vor. Interessanterweise korrelierte in diesen Gruppen keine Milzgewichtszunahme zu der diskutierten graft-versus-host-Aktivität.

Die Wirksamkeit von ALS bei Ersttransplantation in den durchgeführten Versuchen darf als gesichert gelten. Die immunsuppressive Wirkung von ALS bei Spendervorbehandlung ist unter anderem abhängig von seiner freien Zirkulation, der Dauer der Zirkulation und dem Heranreifen immunkompetenter Knochenmark- und/oder Thymuszellen (18). Was den Wirkungsmechanismus anlangt, so spielt möglicherweise das Coating von Zellen (19), vor allem von T-Lymphozyten, eine Rolle (20). Ob die Inhibition von T-Zellen allein ausschlaggebend für die ALS-Wirkung im semiallogenen System ist, ob auch dem genetisch bedingten Fehlen der host-versus-graft-Reaktion eine Bedeutung zukommt oder ob noch andere Faktoren hinzukommen, ist noch nicht mit Sicherheit zu sagen. Sicher jedoch ist, daß thymusabhängige Lymphozyten des Transplantates eine wichtige Rolle bei der graft-versus-host-Reaktion spielen (21). Ebenso gewiß ist, daß T-Lymphozyten einen Proliferationsstimulus benöti-

gen (22, 23). Sicher handelt es sich bei diesem Stimulus um eine 'Targetzelle', die dem leukozytären System des Empfängers entstammt (22).

Mit der Hypothese, daß eine Targetzelle für den Ablauf der graft-versus-host-Reaktion nötig ist, könnte versucht werden, die vorgelegten Versuchsergebnisse zu erklären. Die gegen CBl vorselektierten CBA-Spenderzellen bei der Zweittransplantation sind ja syngene zu den Zellen der Ersttransplantation, finden also im Wesentlichen ein zu ihnen syngenes hämopoetisches System vor⁺, das sie nicht attackieren können; es würde somit der entscheidende Proliferationsreiz fehlen. Allerdings kann eine chronische graft-versus-host-Reaktion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden; die hohe Mitoserate der Zweittransplantatzellen spräche dafür, dagegen spricht die leichte Gewichtszunahme.

Ähnlich auswirken wie ein fehlendes 'target' würde sich das Auftreten von 'enhancing antibodies'. Der vorwiegend in der Tumorummunologie wichtige Mechanismus des Enhancement (32, 33) beruht darauf, daß z.B. gegen fremde transplantierte Tumorzellen Antikörper gebildet werden, die nicht zur Lyse der fremden Zellen führen, sondern im Gegenteil ein besseres Angehen der Tumorzellen bewirken. In einem in vitro-Modell

+

Ein Teil der Empfängerzellen wird trotz 900 r Ganzkörperbestrahlung nicht vernichtet.

ließ sich dieses Phänomen reproduzieren: die Vernichtung von Targetzellen durch sensibilisierte inkompatible Lymphozyten wird inhibiert durch die Zugabe von Antikörpern, die gegen die Targetzellen gerichtet sind. Diese Antikörper decken wahrscheinlich die Antigene der Targetzelloberfläche so ab, daß sie den Rezeptoren der sensibilisierten Lymphozyten nicht mehr zugänglich sind (44). Die Anwendung dieses Modells auf die vorliegenden Versuche würde bedeuten, daß die parentalen Zellen des Ersttransplantates 'enhancing antibodies' gegen die semiallogenen Antigene gebildet haben, auf diese Weise die CBl-Antigene abdecken, so daß den gegen CBl vorsensibilisierten Zweittransplantatzellen das 'target' fehlt. Die Folge wäre eine Aufhebung oder doch zumindest Abschwächung der graft-versus-host-Reaktion, das Transplantat wäre tolerant gegen den Empfänger.

Die Toleranz der transplantierten Zellen ließe sich auch durch die Vermittlung von Suppressor-T-Zellen erklären. GERSHON und KONDO hatten erstmals 1970 (36) darauf hingewiesen, daß sich möglicherweise die Induktion von Toleranz auf eine aktive Rolle von T-Lymphozyten zurückführen ließe. In den folgenden Jahren wurden Suppressor-T-Lymphozyten in verschiedenen Versuchsmodellen zweifelsfrei nachgewiesen (30, 31, 37, 38). Es kann heute als gesichert gelten, daß es nicht nur Suppressor-T-Zellen, sondern auch deren Gegenteil, sog. Helfer-T-Zellen (die mit B-

Lymphozyten kooperieren) gibt (39, 40), wobei Suppressor-T-Zellen wohl auf verschiedene Weisen ihre supprimierende Wirkung entfalten können: sie können anscheinend sowohl über eine Unterdrückung der Helfer-T-Zellen als auch über eine Unterdrückung von B-Zellen eine normale Immunantwort hemmen (41).

Auf die in dieser Arbeit gemachten Versuche angewandt, bedeutet das Suppressor-T-Zellkonzept, daß in der Population der Ersttransplantatzellen Suppressor-T-Zellen vorliegen müßten, welche die Immunantwort der (zu ihnen syngenen) Zweittransplantatzellen supprimieren und damit den Ablauf einer graft-versus-host-Reaktion verhindern.

GLOBERSON et al. (42) hatten in Untersuchungen zum Problem der Toleranzinduktion in einem ähnlichen Versuchsmodell vergleichbare Ergebnisse erhalten: sie hatten letal bestrahlten F_1 -Hybriden parentale Leberzellen embryonaler oder neugeborener Mäuse transplantiert; die darauf folgende Gabe von ebenfalls parentalen Milzzellen erwachsener Spender führte nicht zu einer graft-versus-host-Reaktion. In vitro Versuche nach diesem Schema zeigten dieselben Ergebnisse (ob allerdings intakte Suppressorzellen oder bestimmte Leberfaktoren zur Unterdrückung der graft-versus-host-Reaktion führten, konnte in diesem System nicht entschieden werden).

In eine andere Richtung weisen Untersuchungen von GERSHON und Mitarbeitern, die einen nicht minder interessanten Aspekt der Suppression der graft-versus-host-Reaktion beleuchten: danach wird das Ausmaß der immunologischen Aktivität der parentalen T-Zellen in letal bestrahlten F_1 -Hybriden durch Empfänger- (F_1)-Zellen geregelt. Je nach Ausgangslage der parentalen T-Zellaktivität⁺ (ob geringe oder hohe Aktivität) führt die Zugabe von F_1 -T-Zellen zur Suppression (bei hoher Aktivität der parentalen Zellen) oder zur Verstärkung (bei niedriger Aktivität) der graft-versus-host-Reaktion (43, 45). Überträgt man diese Befunde auf die hier vorgelegten Versuche, so würde dies heißen, daß nicht die Zellen des Ersttransplantates supprimierend wirken, sondern vielmehr noch oder wieder vorhandene Empfängerzellen (was keineswegs abwegig erscheint, denn GERSHON und Mitarbeiter konnten außerdem zeigen, daß selbst mit 900 r bestrahlte F_1 -T-Zellen noch regulierend auf die parentalen T-Zellen wirkten). Kaum in diesem Sinne interpretierbar sind allerdings Ergebnisse aus noch nicht publizierten Untersuchungen (29), wo bei Gabe von noch mehr als 10^8 Milzzellen bei Zweittransplantation wieder eine graft-verus-host-Reaktion auftrat.

+

Aktivität gemessen an der Synthese von DNA und korreliert mit hoher bzw. niedriger Zellzahl.

Um eine umfassende Erklärung der Versuchsergebnisse mittels der diskutierten Mechanismen Enhancement, Suppressor-T-Zellen, sowie des mangelnden Proliferationsreizes aufgrund fehlender Targetzellen geben zu können, müßten noch weiterführende Versuche unternommen werden. Die drei diskutierten Möglichkeiten müssen sich im übrigen keineswegs ausschließen. Auf alle Fälle konnte gezeigt werden, daß im gegebenen System eine Zweittransplantation stimulierter, parentaler Zellen auf F_1 -Hybriden ohne vorhergehende Immunsuppression möglich ist, wenn die Empfängerhämopoese durch eine zum Zweittransplantat syngene parentale Ersttransplantation ausgetauscht wurde.

Versuchssysteme dieser Art könnten bei der Frage von Transplantation innerhalb genetisch nicht verwandter Partner neue Möglichkeiten aufzeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch eine Ersttransplantation von mit ALS immunsupprimierten parentalen Milzzellen auf F_1 -Hybriden wurden hämopoetische Chimären erzeugt, bei denen nach bisherigen Erfahrungen keine Sekundärkrankheit entstehen kann. In diesem System wurden nach konstanter Zeitdauer von 10 Tagen Zweittransplantationen vorgenommen, wobei vorsensibilisierte parentale Milzzellen unter verschiedenen Bedingungen übertragen wurden.

Es wurden variiert:

- (A) die Zellzahl,
- (B) die Bestrahlungsart (Teilkörper- oder Ganzkörperbestrahlung),
- (C) die Strahlendosis.

Als Kontrollen wurden Tiere bei der Ersttransplantation mit syngenen CBl/CBA-Milzzellen transplantiert.

Es konnte gezeigt werden,

1. daß Teilkörperbestrahlung in den angewandten Dosen vor der Zweittransplantation zu einer wesentlich erhöhten Mortalität der Versuchstiere führt;
2. daß eine geringe oder gar keine Ganzkörperbestrahlung vor Zweittransplantation nicht zu akuter Sekundärkrankheit führt, obwohl das Zweittransplantat gegen CBl vorsensibilisiert war und es auch zu einer chromosomenanalytisch nachweisbaren, deutlichen Proliferation des Zweittransplantates kam;

3. daß bei den Tieren der Kontrollgruppe eine ausgeprägtere Proliferation der Zweittransplantatzellen, verbunden mit vorzeitiger Mortalität vorlag, die sich durch Ablauf einer graft-versus-host-Reaktion erklären lassen.

Die Ergebnisse wurden diskutiert unter den Gesichtspunkten des Enhancement, der Suppressor-T-Zellen und des fehlenden Antigenstimulus der Empfängerhämatopoese.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Van Bekkum,D.W., and de Vries,M.J.: In "Radiation Chimaeras" S.20, Logos Press Ltd., Acad.Press Inc. London Ltd. 1967
- 2 Jacobson,L.O.,E.K.Marks, E.O.Gaston,M.Robson and R.E.Zirkle: The role of the spleen in radiation injury. Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 70, 740, 1949
- 3 Lorenz,E.,D.E.Uphoff, T.R.Reid and E.Shelton: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J.Nat.Cancer Inst.12, 197, 1951
- 4 Van Bekkum,D.W. and de Vries, M.J.: In "Radiation Chimaeras" S. 79, Logos Press Ltd., Acad.Press Inc. London Ltd. 1967
- 5 Gray,J.G.,Monaco,A.P.,Wood,L.M.and Russell, P.S.: Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice.I.In vitro and in vivo properties, J.Imm.90, 217, 1966
- 6 Ford,C.E.,Hamerton,J.L.,Barnes,D.W.H. and Loutit,J.F.: Cytological identification of radiation chimeras. Nature 177, 452-454,1956
- 7 Van Bekkum,D.W.and de Vries,M.J.: In "Radiation Chimaeras" S.32-36, Logos Press Ltd., Acad.Press Inc. London Ltd. 1967
- 8 Kolb,H.,S.Thierfelder,P.Baumann and O.Balk: Conditioning recipients of hemopoietic cells with antilymphocytic serum (ALS) and partial body irradiation. Rev.Europ.Études Clin. et Biol.,16,23, 1971

- 9 Parrot,D.M.V.and de Sousa,M.: Thymus-dependent and thymus-independent populations: Origin, migratory patterns and lifespan. Clin.exp.Immunol.8, 663-684, 1971
- 10 Ledney,G.D.and van Bekkum,D.W.: Suppression of Acute Secondary Disease in the Mouse with Antilymphocyte Serum. Aus Advance in Transplantation,S.441, Proc.of the first intern.congr.of the transpl.soc.,Munksgaard 1967
- 11 Dicke,K.A.,van Hooft,J.I.M.and van Bekkum,D. W.: The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures.Transpl.6, 562,1968
- 12 Van Bekkum,D.W.: The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures.I. Effect of storage at 4⁰. Transplantation 2, 393, 1964
- 13 Rodt,H.V.,Thierfelder,S.and Eulitz,M.: Anti-lymphocytic antibodies and marrow transplantation.III.Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice.Europ.J.Immunol.4, 25, 1974
- 14 Amiel,J.L.,Seman,G.,Matsukura,M.and Mathé,G.: Essais de prévention du syndrome secondaire des radiochimères hématopoétiques par l'irradiation des donneurs incompatibles.Rev.Franç. Etudes Clin.Biol.7, 974, 1962

- 15 Thierfelder, S., Werner, J. und Götze, D.: Immunosuppression of the donor in order to affect chronic secondary disease of the recipient. Blut 21, 384-388, 1970
- 16 Ledney, G. and van Bekkum, D.W.: Secondary disease in irradiated mice grafted with allogeneic bone marrow from antilymphocytic serum-treated donors. J. Nat. Cancer Inst. 42, 633, 1969
- 17 Thierfelder, S., Rodriguez-Paradisi, E., Mempel, W. and Beil, E.: Cytology and histology of haemopoietic cell transplantation under the influence of ALS in mice. II. The effect of marrow from donors pretreated with antilymphocyte serum (ALS) on the recipient. Clin. exp. Immunol. 8, 121-129, 1971
- 18 Jeejeeboy, H.F. and Singla, O.: Mode of recovery from the effects of heterologous antilymphocyte serum. II. Recovery of the cells involved in antibody production. Immunology 22, 801-812, 1972
- 19 Brent, L., Courtenay, T., Gowland, G.: Immunological reactivity of lymphoid cells after treatment with anti-lymphocytic serum. Nature 215, 1461-1464, 1967
- 20 Levey, R.H. and Medawar, P.B.: Some experiments on the action of antilymphoid antisera. Ann. N.Y. Acad. Sci. 129: 164-177, 1966
- 21 Cerottini, J.-C., Nordin, A.A. and Brunner, K.T.: Cellular and humoral response to transplantation antigens. I. Development of alloanti-

- body-forming cells and cytotoxic lymphocytes in the graft-versus-host reaction. *J.exp.Med.* 134, 553-564, 1971
- 22 Elkins W.L. and Guttman, R-D.: Pathogenesis of a local graft versus host reaction: Immunogenicity of circulating host leucocytes. *Science* 159, 1250-1251, 1968
 - 23 Biggar, W.D., Meuwissen, H.J., and Good, R.A.: Effect of in vitro irradiation of cells in graft versus host reactions. *Proc.Soc.exp.biol.med.* 137, 1274, 1971
 - 24 Van Bekkum, D.W. and de Vries, M.J.: In "Radiation Chimaeras" S.28 und 30, Logos Press Ltd. Acad. Press Inc. London Ltd. 1967
 - 25 Jones, J.M., Bealmeier, P.M., and Wilson, R.: Modification of secondary disease in germfree radiation chimaeras. *Exp.Hematol.* 21, 18, 1971
 - 26 Bekkum, D.W., van, Vries, M.J., de, Wray, D., van der: Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimaeras. *J.Nat.Cancer Inst.* 38, 223-231, 1967
 - 27 Corneci, I., Andrian, T., Costachel, O. and Feteanu, A.: Antilymphoid globulin in the therapy of secondary disease. *Transpl.Proc.* 3, 422, 1971
 - 28 Van Bekkum, D.W., Ledney, G.D., Balner, H., van Putten, L.M. and de Vries, J.M.: Suppression of secondary disease following foreign bone marrow grafting with antilymphocytic serum. In: *Antilymphocytic serum*, S.97, Churchill, London 1967

- 29 Thierfelder: unveröffentlichte Ergebnisse
- 30 Herzenberg, L.A., Chan, E.L., Ravitch, M.M., Riblet, R.J. and Herzenberg, L.A.: Active suppression of immunoglobulin allotype synthesis. III. Identification of T-cells as responsible for suppression by cells from spleen, thymus, lymph node, and bone marrow. J.exp.Med. 137, 1311-1324, 1973
- 31 Okumara, K. and Tomio Tada: Suppression of hapten-specific antibody response by carrier specific T-cells. Nature N.Biol. 245, 180, 1973
- 32 Russell, P.S.: Immunological Enhancement. Transpl.Proc. 3, 960-966, 1971
- 33 Feldmann, M. and G.J.V. Nossal: Tolerance, enhancement and the regulation of interactions between T cells, B cells and macrophages. Transplant.Rev. 13, 3-34, 1972
- 34 Barnes, D.W.H., Loutit, J.F. and Micklem, H.S.: "Secondary disease" in lethally irradiated mice restored with syngeneic or allogeneic foetal liver cell. In 'Mechanisms of Immunological Tolerance', (Ed. M. Hasek, A. Lengerova, M. Vojtiskova), Prague, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 371-377 1962
- 35 Cudkowicz, G.: Suppression of the foreign bone marrow reaction by preirradiation of donor mice. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 107, 821-824, 1961

- 36 Gershon,R.K.und Kondo,K.: Cell interactions in the induction of tolerance.The role of thymic lymphocytes.Immunology 18, 723, 1970
- 37 Herzenberg,L.und Herzenberg,L.: Short term and chronic ,allotype suppression in mice. In: Contemporary Topics in Immunology 3, eds. Cooper,M.D.and Warner,N.L.S.41, Plenum Press, N.Y.,1974
- 38 Weber,G.und Kölsch,E.: Transfer of low zone tolerance to normal syngeneic mice by A positive cells. Europ.J.Immunol.3,767, 1973
- 39 P.J.Baker: Homeostatic Control of Antibody Responses: A model based on the recognition of cell-associated antibody by regulatory T cells. In: Transplant.Rev.26,S.3-20, Munksgaard,Copenhagen 1975
- 40 Dutton,R.W.: Suppressor T cells. Transplant. Rev.26, S.39-55,Munksgaard,Copenhagen,1975
- 41 Kölsch,E.,Stumpf,R.und Weber,G.: Low Zone Tolerance and Suppressor T Cells. Transplant. Rev.26,S.56-85, Munksgaard, Copenhagen,1975
- 42 Globerson,A.,Zinkernagel,R.M.and Umiel,T.: Immunosuppression by embryonic liver cells. Transplantation 20,S.480-484,1975
- 43 Gershon,R.K.: A Disquisition on Suppressor T Cells.Transplant.Rev.26,S.170-185,Munksgaard,Copenhagen,1975
- 44 I.M.Roitt: Essential Immunology,S.169, Third Printing 1972,Blackwell Scientific Publications, Oxford
- 45 Gershon,R.K.,Liebhaber,S.and Ryu,S.: T Cell Regulation of T-Cell Responses to Antigen. Immunology 26, 909, 1974

LEBENS LAUF

17.11.1944	geboren in Reichenberg (Sudetenland) als Sohn der Eheleute Hans Hüttl und Irmtraut Hüttl, geb.Sekora
1950 - 1953	Besuch der Volksschule in Bayreuth
1953 - 1964	Besuch der Volksschule und des Gymnasiums in Stuttgart
26.2.1964	Reifeprüfung
1964 - 1966	Ausbildung zum Sanitätsoffizier der Bundeswehr
1966 - 1968	Studium der Philosophie an der Universität München
1968 - 1973	Studium der Medizin an der Universität München
Dezember 1973	Staatsexamen
April 1974 - März 1975	Medizinalassistentenzeit im Städt.Krankenhaus Rosenheim
Seit 1.4.1975	Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am pharmakologischen Institut der Universität München

